

dc\_951\_14

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

# Funkcionális anatómiai változások Alzheimer-kórban

**Alpár Alán**

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet  
Magyar Tudományos Akadémia, Kísérletes Neuroanatómiai és  
Fejlődésbiológiai Kutatócsoport

Budapest, 2014

## Tartalom

1. Bevezetés.....	5
1.1 A humán amiloid prékurzor fehérje és azok fragmensei.....	6
Az amiloid prékurzor fehérje a neurodegeneratív folyamatok tükrében .....	8
1.2. A tau fehérje és foszforilációjának szerepe Alzheimer-kórban .....	11
1.3. A Ras G-fehérje és a citoszkeleton kapcsolata .....	12
A p21Ras fehérje neurodegeneratív folyamatokban betöltött szerepe .....	13
1.4. Az endokannabinoid rendszer és a szinaptikus működés .....	14
Endokannabinoidok a neurodegeneratív folyamatok tükrében .....	15
1.5. Az extracelluláris mátrix jelenléte a központi idegrendszerben .....	15
Az extracelluláris mátrix megjelenési formái a központi idegrendszerben .....	15
A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix kémiai összetétele.....	17
2. Célkitűzések .....	20
3. Anyag és módszer .....	22
3.1. Állati minták, az állatok kezelése, beavatkozások.....	22
3.2. Humán minták .....	26
3.3. Az agyvelő fixálása, metszése.....	27
3.4 A metszetek kezelése, képalkotás.....	28
3.5. Mennyiségi analízisek .....	31
3.6. Western blotting és enzimmel kötött immunszorbens módszer (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) .....	35
4. Eredmények .....	36
4.1. A dendritfa és az inter-neuronális kapcsolatok változásai amiloid prékurzor fehérje transzgenikus egérmodellekben .....	36
Emelkedett szolubilis A $\beta$ szint és az extracelluláris amiloid lerakódás hatásai .....	36
Amiloid lerakódáshoz nem vezető prékurzor protein expresszió hatásai.....	41
Az amiloid prékurzor fehérje expressziója és az afferentáció változásai .....	43

Az afferens depriváció morfogenetikai hatásai .....	48
Az önkéntes mozgásaktivitás morfogenetikai hatásai .....	52
4.2. Strukturális és memória változások hibernációban .....	59
4.3. A p21H-ras <sup>Val12</sup> fehérje expresszió hatása a differenciált agyvelőben .....	62
Szomatoszenzoros kéregben tett megfigyelések .....	63
Hippokampuszban tett megfigyelések.....	80
A p21H-ras <sup>Val12</sup> fehérje hatása afferens deprivációban.....	85
A p21H-ras <sup>Val12</sup> expresszió hatása önkéntes fizikai aktivitásban.....	92
4.4. Az endokannabinoid rendszer változásai Alzheimer-kórban .....	96
A 2-arachidonoil-glicerolhez kapcsolódó szignálrendszer változásai.....	96
Anandamid metabolizmussal kapcsolatos megfigyelések .....	101
4.5. Sejtproliferációval kapcsolatos megfigyeléseink a neurodegeneratív változások tükrében .....	102
Sejtproliferáció és differenciálatlan neuronok alacsony enkefalizációs indexű állatban.....	103
A humán vad típusú amiloid prékurzor fehérje neurogenetikus hatása .....	108
Differenciálatlan neuronok az ember szaglórendszerében .....	112
Secretagogint expresszáló neuronok a tractus olfactoriusban.....	113
A secretagogin expressziójának változásai Alzheimer-kórban .....	115
4.6. Az extracelluláris mátrix perineuronális kompartmentalizációja és neurodegeneratív folyamatokban betöltött szerepe .....	118
Filogenetikai kitekintés: az extracelluláris mátrix rendeződése a differenciált neuronokkal világra jövő házi csirke (Gallus domesticus) agyában .....	118
A periszinaptikus mátrix izolált jelenléte és kémiai összetétele .....	122
Az extracelluláris mátrix perineuronális eloszlása az ember hippocampusában.....	127
Az extracelluláris mátrix változásai Alzheimer-kórban .....	134
5. Megbeszélés .....	138
5.1. Az amiloid prékurzor fehérje neuromorfogenezisben és sejtszaporodásban megfigyelt aspektusai.....	138

5.2. Reverzibilis tau foszforiláció, szinapszis újjáépülés és memórianyomok hibernációs állapotmodellben .....	144
5.3. A p21Ras fehérje expressziójának hatása a differenciált agykéregben.....	146
5.4. Az endokannabinoid metabolizmus változásai Alzheimer-kórban .....	153
5.5. Proliferációs képesség és differenciálatlan sejtek azonosítása a szaglórendszerben .....	155
Differenciálatlan sejtek idős emberek szaglórendszerében .....	156
A tractus olfactorius sejtjeinek változásai Alzheimer-kórban .....	157
5.6. Az extracelluláris mátrix Alzheimer-kórban megfigyelt változásai .....	157
Az extracelluláris mátrix szerepe neuropatológiai elváltozásokban .....	158
5.7. Tudományos munkásság összefoglalása .....	162
6. Supplementum .....	164
7. Köszönetnyilvánítás.....	180
8. Irodalomjegyzék .....	181



## 1. Bevezetés

Az Alzheimer-kór az életkor előrehaladtával fokozódó gyakorisággal fellépő megbetegedés, mely a kognitív funkciók krónikus és progresszív beszűkülésével jár. Az életkor öröndetes, a világ nagy részén tapasztalható növekedésével a betegség korunk egyik legnagyobb orvosi problémájává vált, mely hatalmas szociális és gazdasági terhet ró társadalmainkra (Alloul és *mtsai*, 1998; Kovács, 2009). Korai stádiumban való felismerése (Bódi és *mtsai*, 2009; Z. Oláh és *mtsai*, 2012; E. Papp és *mtsai*, 2012; Varga és *mtsai*, 2014), progressziójának fékezése (Kincses és *mtsai*, 2013; Radak és *mtsai*, 2010) intenzív kutatás tárgya. Az Alzheimer-kór pontos patomechanizmusa nem ismert. A kutatók több évtizeden keresztül a bazális előagyi, ezen belül a kolinerg neuronok és a következményes kérgi kolinerg innerváció pusztulásában keresték a betegség fő okát (Grothe és *mtsai*, 2010; Pákáski és *mtsai*, 2014; Szigeti és *mtsai*, 2013; Záborszky és *mtsai*, 1999). Intenzíven vizsgálták a genetikai háttérrel is bíró (Arendt és *mtsai*, 1997; Fehér és *mtsai*, 2013; Fehér és *mtsai*, 2012; Seeger és *mtsai*, 2009) molekuláris történések széles spektrumát, beleértve a fehérje hibás térszerkezeti alakulását (protein misfolding) (Juhász és *mtsai*, 2011; M. E. Tóth és *mtsai*, 2013) a nukleozid metabolizmust (Z. Kovács és *mtsai*, 2011), a szinaptikus működés megváltozásának különböző molekuláris hátterét (Fehér és *mtsai*, 2013; Selkoe, 2008b; Walsh és *mtsai*, 2002; Zádori és *mtsai*, 2014).

Az Alzheimer-kór jellegzetes, a citoszkeletont is érintő (Fodor és *mtsai*, 2011) patomorfológiai változásokat indít el a központi idegrendszerben: amiloid fehérjék rakódnak le az agyi parenchymában és az érfalakban (Selkoe, 1991, 2008a; Thal és *mtsai*, 1999), az idegsejtekben kóros neurofilamentumok képződnek (Avila, 2000), ami a neuronok, különösen azok preszinaptikus terminálisainak pusztulásához és reaktív gliózishoz vezet (Terry és *mtsai*, 1991). Az elfajulás súlyossága a különböző agyi régiókban nagyban és specifikusan különbözik, mely arra utal, hogy bizonyos – kiemelten kérgi - neurális elemek különösen sérülékenyek a még részben mindig ismeretlen patobiokémiai folyamatokban (H. Braak és Braak, 1991; H. Braak és *mtsai*, 1993; K. Jellinger és *mtsai*, 1991; Sipos és *mtsai*, 2007). A jelenleg uralkodó felfogás szerint a terápiás lehetőségeket ezen történések molekuláris mechanizmusának megértése mozdíthatná legjobban elő (M. I. Papp és Kovács, 2013; Penke és *mtsai*, 2012; Polgár és Keserű, 2014).

A humán minták mellett, kórszövettani és ehhez kapcsolódó idegéletteni, biokémiai és viselkedéstani vizsgálatok széles körben kezdtek alkalmazni transzgenikus egérmodelleket. Ezekkel a genetikailag módosított állattörzsekkel a betegség jeleinek teljes spektrumát modellezni mindeddig nem sikerült, és a cél legtöbb esetben nem is

ez volt (LaFerla és Green, 2012). Ellenkezőleg: a kórfolyamatok kiemelt aspektusai külön vizsgálhatóvá váltak, melyek a különböző patomechanizmusok további és jobb megismerhetőségét tette lehetővé, a terápiás beavatkozások és megelőzés új farmakológiai célpontjait fedte fel (Bales, 2012).

Ebben a fejezetben tekintjük át tömören azon tudnivalókat, melyek a Célkitűzés fejezetben ismertett céjaink megfogalmazásához és megértéséhez nélkülözhetetlen háttérismeretként szolgálnak. Munkám első része a kérgi és hippokampális principális sejtek funkcionális-alaki sajátosságait, afferenseinek és efferenseinek változásait, a sejtprolifráció és -differenciálódás alakulását vizsgálja olyan transzgenikus egérmodellekben, melyekben egyes, az Alzheimer-kórban kulcsszerepet játszó fehérjék expressziója megváltozik. A különböző állattörzsekben így alkalmunk nyílt a betegség patogenezisében kiemelt jelentőségű A $\beta$  fehérjének és prékurzor proteinjének vizsgálata mellett egy, az Alzheimer-kór korai stádiumában aktiválódó - jellemzően neurotrofinok és növekedési faktorok indukálta – jelátviteli mechanizmus okozta citoskeletális változásokat is nyomon követni. A deprivációs- és ingergazdag környezetben megfigyelt funkcionális anatómiai változások azokat a környezeti hatásokat célozták modellezni, melyek az Alzheimer-kór progresszióját, ha korlátozva is, de befolyásolni képesek (Laurin és *mtsai*, 2001; Miklya és Gaszner, 2004; Pope és *mtsai*, 2003; Radak és *mtsai*, 2010). A betegségben tapasztalt memóriazavarok és a tau fehérje foszforilációjának kapcsolatát a hibernációban reverzibilis tau hiperfoszforilációra képes állatban vizsgáltuk (Arendt és *mtsai*, 2003). Ezekkel a vizsgálatokkal a betegség legkorábbi stádiumában fellelhető anatómiai és biokémiai folyamatokat hoztuk párhuzamba az emlényom kialakulásával.

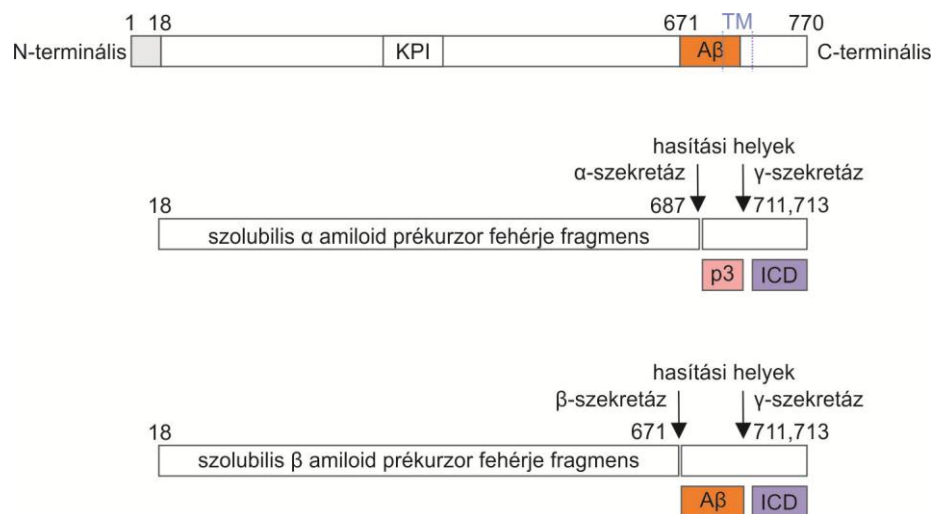
A neurodegeneratív betegségek célkeresztjében lévő szinapszisok közvetlen környezetét az extracelluláris mátrix képezi. Összetétele, kémiai heterogenitása – egyáltalán léte – a központi idegrendszerben az utolsó évtizedig a neurobiológiai érdeklődés perifériájára szorult. Munkám második felében az Alzheimer-kórban történő szinaptikus változások és a periszinaptikus extracelluláris mátrix kapcsolatát humán mintákon vizsgáltam. Ehhez a perineuronális mátrix kompartmentspecifikus összetételét és anatómiai jellemzését megelőző tanulmányokban kellett elvégezzük.

### **1.1 A humán amiloid prékurzor fehérje és azok fragmensei**

#### *A prékurzor fehérje*

Az amiloid prékurzor molekula egy integráns membránfehérje, melyet egy legalább 18 exonból álló gén kódol a 21-es kromoszómán (Goldgaber és *mtsai*, 1987; Kang és *mtsai*, 1987; Tanzi és *mtsai*, 1987; Yoshikai és *mtsai*, 1990). Amiloid prékurzor fehérjét

csaknem valamennyi sejtünk termel, a protein – és további sorsa – mindazonáltal nagyon heterogén (Selkoe, 2001). A glikoprotein pre-mRNS-einek alternatív átszabásával („splicing”) legalább négy átirat jön létre, melyek 695, 714, 751 és 770 aminosav hosszúságú fehérjéket kódolnak (Golde és *mtsai*, 1990; Kang és *mtsai*, 1987; Ponte és *mtsai*, 1988; Rossner és *mtsai*, 1998a). Idegsejtekben – ellentétben a legtöbb nemneuronális sejtrel, melyek a 751 és 770 aminosav hosszúságú fragmensekben gazdagok – a 695 aminosav hosszúságú rövid fragmens fordul elő (Rossner és *mtsai*, 1998b; Selkoe, 2008a). A molekula N-terminális nagyobb része extracelluláris helyzetű, vagy intracelluláris vezikulumok lumenében található, ezt követi egy transzmembrán szakasz, végül a C-terminális citoszolikus rész (1. ábra).



**1. ábra.** Az amiloid prékurzor fehérje szerkezeti és a szekretáz enzimek hasítási helyei. **Rövidítések:** **ICD** intracelluláris domén, **KPI** Kunitz típusú szerin proteáz gátló domén, **p3** p3 peptid, **TM** transzmembrán domén.

A prékurzor fehérjét szekretázok hasítják metabolit származékaikra. Az α-szekretázok a membrántól meghatározott távolságban hasítanak, nem szekvencia-specifikusak, és más fehérjéket is képesek vágni. Az amiloid prékurzor fehérjének csak kis hányadát hasítják (Sisodia, 1992). A hosszú extracelluláris fragmenszen kívül fennmaradó C-terminális részt a γ-szekretáz vágja tovább egy p3 nevű, valamint egy intracelluláris doménre (1. ábra). Az α-szekretázok által megkímélt amiloid prékurzor molekulákról a β-szekretáz (más nevén BACE-1) hasíthat le egy hosszú szolubilis N-terminális véget, a C-terminális részből pedig a γ-szekretáznak köszönhetően képződik a neurodegeneratív kórképekben kiemelt jelentőségű β-fragmens és egy valamivel kisebb méretű citoszolikus fragmens (1. ábra).

*In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy amiloid prékurzor molekulák folyamatosan képződnek az idegsejtekben (Weidemann és *mtsai*, 1989). A β-szekretáz

működésének eredményeképp a sejtmembránhoz kötött prékurzorokból lehasad az N-terminális rész (J. P. Anderson és *mtsai*, 1991; Haass, Koo, és *mtsai*, 1992; Sisodia, 1992), ami a külső (ekto)domén szekrécijához vezet, vagy internalizálódik és lebomlik az endoszómákban és lizoszómákban (Golde és *mtsai*, 1992; Haass, Koo, és *mtsai*, 1992). Ezzel összhangban sejt kultúrákban megfigyelték, hogy a tenyésztett sejtek folyamatosan szekretálnak A $\beta$  fehérjét (Haass, Schlossmacher, és *mtsai*, 1992; Shoji és *mtsai*, 1992), *in vivo* vizsgálatok pedig a liquor cerebrospinalisban detektálták ezt a fragmenst (Seubert és *mtsai*, 1992).

#### *Az A $\beta$ fragmens*

Az A $\beta$  fragmens és az amiloid keletkezésének oka és mechanizmusa már korán intenzív kutatások kereszttüzébe került. Az A $\beta$  fragmensek nemcsak szolubilis formában vannak jelen az agyszövetben, hanem extracellulárisan lerakódhatnak, plakkokat alkothatnak (Allsop és *mtsai*, 1983), mely az Alzheimer-kór egyik hisztopatológiai markere. Széles körben elfogadott tény, hogy a kérgi A $\beta$  fragmens szint illetve plakkok mennyisége kognitív károsodást okoz, amiért mind a szolubilis, mind a kicsapódott fehérje felelős (Cummings és *mtsai*, 1996; Hardy és Allsop, 1991; Naslund és *mtsai*, 2000; Selkoe, 2008b). Diffúz típusú A $\beta$  depozitumok ugyanakkor egészséges idősokban is előfordulnak, illetve Alzheimer-kórban szenvedők olyan agyi területein is (például talamusz, kisagy), melyek a betegségben nem károsodnak (Y. T. Li és *mtsai*, 1994; Wisniewski és *mtsai*, 1989). Alzheimer-kórban szenvedők nagyagykérgében előbbivel ellentétben – illetve azok átalakulásával - ún. neuritikus plakkok jönnek létre, melyek 8-10nm méretű amiloid rostokat tartalmaznak, összetevőik között nemcsak a 42 aminosav hosszúságú (A $\beta$ 42), hanem a rövidebb A $\beta$ 40 peptidet is megtaláljuk. A filamentózus és nemfibrilláris szerkezetű fehérjékből felépülő képletek közelében a mikrogliák és asztrociták aktiválódnak, a neuronok károsodnak (Itagaki és *mtsai*, 1989; Selkoe, 1991).

#### ***Az amiloid prékurzor fehérje a neurodegeneratív folyamatok tükrében***

A neuropatológiai elváltozásokhoz vezető folyamatok fő okaként többek között az amiloid prékurzor fehérje magas szintű expresszióját, szekréciónak ütemének megváltozását, illetve a 695 és 751/770 aminosav hosszúságú fragmens keletkezése közötti egyensúlyát jelölték meg (Price és *mtsai*, 1992; Selkoe, 1991; Sisodia és Price, 1992). Döntő előrelépést jelentett, amikor az amiloid prékurzor molekula mutációját kimutatták több betegségben is, így familiáris Alzheimer-kórban (Chartier-Harlin és *mtsai*, 1991; Murrell és *mtsai*, 1991) vagy amiloidózissal járó hereditár cerebrális haemorrhagiában (Levy és *mtsai*, 1990; Van Broeckhoven és *mtsai*, 1990). Erre a

megfigyelésre alapozva és a transzgenikus technikák ugrásszerű fejlődésével egymás után hoztak létre kutatócsoportok olyan egértörzseket, melyekben a vadttípusú vagy mutáns fehérje expressziós szintjét megváltoztatták.

Az amiloid prékurzor fehérje nemcsak fragmensei forrásaként, hanem önmagában is befolyásol biológiai folyamatokat. A teljes hosszúságú („full-length”) molekula szerepét izoláltan vizsgálni nehéz, hiszen expressziós szintjének változtatása keletkező fragmenseinek szintjét sem hagyja változatlanul (P. R. Turner és *mtsai*, 2003). Neuroprotekciónban betöltött szerepét a Notch jelátviteli mechanizmushoz kapcsoltan vizsgálták (De Strooper és *mtsai*, 1999), az axon növekedési csúcs végarborizációjának és szinapszisainak kialakításáért pedig a sejtadhéziós mechanizmusok szabályozásán keresztül tulajdonítottak neki szerepet (Moya és *mtsai*, 1994). A sejtszintű neuronális mechanizmusokban az amiloid prékurzor fehérje serkenti továbbá a neuritek kinövését, elongációját és elágazódását (Ohsawa és *mtsai*, 1997; Salinero és *mtsai*, 2000; Small és *mtsai*, 1994). Ennek megfelelően az amiloid prékurzor fehérjét nem tartalmazó idegsejtek dendrit nyúlványai rövidebbek és kevésbé elágazódóbbak (Perez és *mtsai*, 1997; Seabrook és *mtsai*, 1999), bár ezzel ellentétes eredmények is napvilágot láttak (Harper és *mtsai*, 1998).

*In vivo* morfológiai és rendszer-anatómiai vizsgálatok szerint a neuronális kompartmentekben, így a szinapszisokban is jelenlévő amiloid prékurzor fehérje (Kirazov és *mtsai*, 2001; Schubert és *mtsai*, 1991; Shigematsu és *mtsai*, 1992) a preszinaptikus domén morfológiai és funkcionális szabályozásán keresztül szerepet játszik a szinapszisok kialakításában, ezáltal a szinaptikus plaszticitásban, a felnőtt idegrendszerben is (Buxbaum és *mtsai*, 1998; Sisodia és *mtsai*, 1993). Így amiloid prékurzor fehérje génkiütött állatokban viselkedésszerű és kognitív hiányosságok, a hosszútávú potenciáció („long term potentiation”, LTP) zavara és a szinapszisok számának csökkenése lép fel (Dawson és *mtsai*, 1999; Phinney és *mtsai*, 1999). Ezek az eredmények összecsengenek más tanulmányok adataival, melyek az amiloid prékurzor fehérje expressziójának növekedéséről számolnak be a tanulást és emlékeztet serkentő állattartás/kezelés során (Huber és *mtsai*, 1997; Teather és *mtsai*, 2002). Olyan állatokban azonban, ahol a humán amiloid prékurzor fehérje expressziója többszöröse a vadttípusúakban találtaknak, és ez a szolubilis A $\beta$  szint növekedéséhez vezet, a szinapszisok működése sérül. Ez a kognitív képességek károsodásához vezet – függetlenül attól, hogy  $\beta$ -amiloid lerakódás történik-e (Kamenetz és *mtsai*, 2003; Lanz és *mtsai*, 2003; Mucke és *mtsai*, 2000; A. M. Simon és *mtsai*, 2009), mely az Alzheimer kór kialakulásának korai stádiumának hipotézisét („early stage hypothesis”) erősíti.

Vizsgálataink idejében nem volt ismert, milyen változásokat indít el a trofikus hatásának sejtett vad típusú fehérje az idegsejtek alaktanában, az afferens kapcsolatokat kialakító dendritfa és dendrittüske méretében, geometriájában és mennyiségében. Hasonló vizsgálatok mutáns amiloid prékurzor fehérje expressziójának hatására és áttekintő jellemzésre (teljes dendritfa méret) szorítkoztak (Moolman és *mtsai*, 2004).

#### *Az A $\beta$ fehérje neurodegeneratív vonatkozásai*

Az amiloid prékurzor fehérje szekréciójának, hasításának megváltozása kóros folyamatokat indít be a neuronok működésében, morfológiájában, így azok funkciójában és az agykéreg egészének működésében (Juhász és *mtsai*, 2011; J. Oláh és *mtsai*, 2011). A kulcsszerepet a fehérjét hasító  $\beta$  és  $\gamma$ -szekretáz enzimek működésének megváltozásában látják, melyek az A $\beta$  fragmens képzéséért felelősek (P. R. Turner és *mtsai*, 2003). A $\beta$  fragmensek élettani körülmények között is képződnek (Haass, Schlossmacher, és *mtsai*, 1992). Az Alzheimer-kór kialakulásának előfutára a szolubilis A $\beta$  fehérje szintjének növekedése, mely végül extracelluláris, inszolubilis plakkok kialakulásához vezet (Selkoe, 2008a; P. R. Turner és *mtsai*, 2003). Ez neurotoxikus folyamat, melyet mind *in vitro*, mind *in vivo* számos kísérletben bizonyítottak (McKee és *mtsai*, 1998; Walsh és *mtsai*, 2002). A glutamáterg és kolinerg aktivitás csökkentése illetve megváltoztatása révén az A $\beta$  fehérje zavart okoz a szinaptikus transzmisszióban (Chen és *mtsai*, 2002; Jhamandas és *mtsai*, 2001; Kar és *mtsai*, 1996; Uhasz és *mtsai*, 2010). Gátolja a hosszú távú potenciáció kialakulását, ami a szinaptikus plaszticitás csökkenéséhez vezet (Raymond és *mtsai*, 2003; Wang és *mtsai*, 2002), mindez pedig a tanulási folyamatok romlását és memóriacsökkenést von maga után (Flood és *mtsai*, 1991). A felsorolt degeneratív változások később az agyszövet hisztopatológiájában is nyomon követhetők; az A $\beta$  fehérje fragmensek fibrillumokba, majd plakkokba csapódnak össze, ez összességében az idegsejtek kapcsolatrendszerének megszakításához vezet, melynek mértéke az elbutulás (dementia) súlyosságával arányos (Cummins és *mtsai*, 1996; Knowles és *mtsai*, 1998).

Alzheimer-kórban több neuromorfológiai változásról történt említés. Az idegsejtek nyúlványainak progresszív disztrófiáját, ektopikus burjánzását, görbületeinek növekedését mind humán mintákon, mind transzgenikus állatokban megfigyelték (Irizarry és *mtsai*, 1997; Knowles és *mtsai*, 1999; Lerner, 1995; Scheibel és Tomiyasu, 1978). Vizsgálódásunk idejében ennek fő okát az A $\beta$  fokális hatásában, lerakódásában látták. Így az A $\beta$  lerakódásokon áthúzódó idegsejt nyúlványok morfológiája megváltozik, degeneratív jelenségeket mutat; átmérőjük kisebb lesz, a dendriteken

található dendrittüskék sűrűsége csökken (Knowles és *mtsai*, 1999; Le és *mtsai*, 2001; Tsai és *mtsai*, 2004), szélsőséges esetben a nyúlvány egyszerűen megszakad, „eltörik” (Tsai és *mtsai*, 2004). Jellemző, hogy A $\beta$  plakkok közelében a szomszédos dendritek, dendritszakaszok sűrűsége csökken (Knowles és *mtsai*, 1998).

Munkánkban azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a humán és mutáns amiloid prékurzor fehérjék különböző szintű expressziója, továbbá a plakk lerakódással járó, emelkedett A $\beta$  szint az idegsejtek alaktanát és azok kapcsolatait. A fokális változások helyett a sejt egészére koncentráltunk, hogy átfogóbb képet kaphassunk az Alzheimer-kórban bekövetkező változások neuromorfológiai hátteréről. Vizsgálatainkat a dendritek és dendrittüskék mennyiségi analízisén túl kiterjesztettük az afferens és efferens kapcsolatok, szinapszisok változásaira. Deprivációs és ingergazdag környezetben végzett kísérletek igazolták, hogy az afferens és környezeti ingerek döntően befolyásolják az amiloid metabolizmusban változást szenvedő sejtek alaktanát és inter-neuronális kapcsolatait.

## 1.2. A tau fehérje és foszforilációjának szerepe Alzheimer-kórban

A tau fehérje egy mikrotubulus-asszociált fehérje, mely a tubulin fehérje polimerizációját, ezáltal a mikrotubulusok stabilizációját segíti (Drechsel és *mtsai*, 1992; Weingarten és *mtsai*, 1975). Ha a tau fehérje szerin és treonin reziduumai foszforilálódnak, affinitása a mikrotubulusokhoz csökken, és a tau fehérje az axoplazmából a szomatodendritikus és szubszinaptikus kompartment felé helyeződik át (Biernat és *mtsai*, 1993; Buee és *mtsai*, 2000; Lindwall és Cole, 1984; Morris és *mtsai*, 2011). Erősen (ún. hiper-) foszforilált formája az Alzheimer-kórban megfigyelt páros helikális filamentumok és aberráns neurofibrilláris lerakódások fő alkotója a megbetegedett idegsejtek citoplazmájában, melyet összefoglalóan „taupátiának” hívunk (Avila, 2000; Brandt és *mtsai*, 2005; Goedert és Spillantini, 2011; Shahani és Brandt, 2002).

Míg a neurohisztopatológia az aberráns neurofibrillumok megjelenését az Alzheimer-kór legfőbb jelenségének tartja a  $\beta$ -amiloid plakkok megjelenése mellett, több tanulmány kimutatta, hogy a hiperfoszforilált tau megjelenése a posztzinaptikus kompartmentben jóval azelőtt vezet szinaptikus és kognitív zavarokhoz, mielőtt tau aggregátumok a pusztuló idegsejtben megjelennének (Hoover és *mtsai*, 2010; Ittner és *mtsai*, 2010; Morris és *mtsai*, 2011; Yoshiyama és *mtsai*, 2007). Ennek megfelelően Alzheimer-kór már igen korai stádiumában találtak tau felhalmozódást hippokampális CA3 piramissejtek dendrittüskéiben (Blazquez-Llorca és *mtsai*, 2011). Tau hiperfoszforiláció azonban élettani körülmények között is előfordul hibernációra képes

emlősökben (Arendt és *mtsai*, 2003; Härtig és *mtsai*, 2007), mely a szinapszisok számának csökkenésével jár (von der Ohe és *mtsai*, 2007), az ehhez kapcsolódó, ébredés utáni tanulási- és memória folyamatokkal foglalkozó tanulmányok ugyanakkor ellentmondó eredményekre jutottak egy irreverzibilis károsodást vagy csupán nyomvesztést illetően (Clemens és *mtsai*, 2009; McNamara és Riedesel, 1973; Millesi és *mtsai*, 2001; Zhao és *mtsai*, 2004). Munkánkban szíria aranyhőrcsögben vizsgáltuk a tau foszforiláció, a szinaptikus regresszió és a memórianyomok viszonyát egy összehangolt viselkedéstani, biokémiai és neuromorfológiai kísérletben.

### 1.3. A Ras G-fehérje és a citoskeleton kapcsolata

Az idegsejtek belső vázát a citoskeletonális fehérjék alkotják, melyek dinamikus átépülésre képesek. A folyamatot számos faktor irányítja, befolyásolja, melyek közül fontosságukat tekintve kiemelkednek a növekedési faktorok, így a különböző neurotrofinok, az idegi eredetű növekedési faktor (nerve growth factor, NGF) vagy az agyi eredetű növekedési faktor (brain derived neurotrophic factor, BDNF) (Davies, 2000; Heumann, 1994; Thoenen, 1995). Neurotrofinok irányítják a sejtek nyúlványainak képződését, növekedését, a dendritfa kialakulását mind a fejlődő (Baker és *mtsai*, 1998; Horch és *mtsai*, 1999; McAllister, 2002; McAllister és *mtsai*, 1996; McAllister és *mtsai*, 1995; Niblock és *mtsai*, 2000), mind a felnőtt agykéregben (Horch és Katz, 2002). A dendritek mellett az axonok növekedését is kritikusan befolyásolják: serkentik azok hosszabbodását (Kirstein és Farinas, 2002; Tucker, 2002), célirányított növekedését (pathfinding) (Song és Poo, 1999), véggarborizációját (Purves és *mtsai*, 1988) valamint szinaptikus kapcsolatainak kialakulását és differenciálódását (Causing és *mtsai*, 1997).

A neurotrofinok indukálta citoskeletonális változások G-proteinek működésén keresztül valósulnak meg (Z. Li és *mtsai*, 2002; McAllister, 2000; Sin és *mtsai*, 2002). Az aktinvázat legismertebben szabályozó Rho családhoz tartozó fehérjék mellett (Luo és *mtsai*, 1997; Smith, 1999) hamar ráterelődött a figyelem a p21Ras fehérjére. Ez a G-protein kinázok foszforilációja és az elindított kaszkádok révén enzimek aktivitását, ioncsatornák működését, gének expresszióját, mindezek által a sejt morfológiáját magát is szabályozza (Ahn, 1993; Heumann, 1994; Nishida és Gotoh, 1993). Jóllehet eukarióta sejtben általánosan előforduló fehérjéről van szó, a p21Ras agyi expressziója a más szövetekben találtaknak csaknem tízszerese (Furth és *mtsai*, 1987; Tanaka és *mtsai*, 1986). *In vitro* tanulmányok a p21Ras fehérje neuronális differenciálódásban betöltött szerepére világítottak rá (Bar-Sagi és Feramisco, 1985; Guerrero és *mtsai*,



1986; Noda és *mtsai*, 1985), míg *in vivo* kísérletek felnőtt állatban a lézió után fellépő károsodással szemben protektív hatásúnak találták (Heumann és *mtsai*, 2000).

### **A p21Ras fehérje neurodegeneratív folyamatokban betöltött szerepe**

Az Alzheimer-kór egyik jellegzetes pathobiokémia története a citoszólban található tau fehérjék nagyfokú foszforilációja, ami kórosan feltekeredett, helikális filamentek („paired helical filaments”, PHF) létrejöttéhez vezet (Augustinack és *mtsai*, 2002). A betegség korai fázisában számos növekedési és mitogén faktor szintje emelkedik, melyek a p21Ras G-fehérje aktiválása révén fejtik ki hatásukat (Connor és *mtsai*, 1997; Crutcher és *mtsai*, 1993; Fahnstock és *mtsai*, 1996; Fenton és *mtsai*, 1998; Gomez-Pinilla és *mtsai*, 1990). Alzheimer-kórban helyét, alakját és összetételét tekintve kóros nyúlványokat azonosítottak idegsejteken (Arendt és *mtsai*, 1995). A vizsgált G-fehérje Alzheimer-kórban betöltött szerepére további figyelem fordult, amikor kiderült, hogy részt vesz a tau fehérje expressziójának (Sadot és *mtsai*, 1998) és foszforilációjának (Greenberg és *mtsai*, 1994) szabályozásában. A p21Ras fehérje a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalat aktiválja, mely kináznak expressziós szintje és aktivitása Alzheimer-kórban emelkedik, és ez a kináz felelős a tau protein kóros transzformációjához vezető foszforilációjáért (Drewes és *mtsai*, 1992). Bizonyították, hogy a p21Ras fehérje expressziós változása Alzheimer-kórban nemcsak egy neurodegeneratív változásra adott sejtszintű válasz, hanem már a betegség korai szakaszában fellépő jelenség, mely a tau-hiperfoszforiláció és amiloid képződés előtt, azokat megelőzve történik (Gärtner és *mtsai*, 1999).

A p21Ras fehérje ugyanakkor az amiloid prékurzor protein és amiloid szintézis kapcsán is górcső alá került. Az amiloid prékurzor fehérje metabolizmusában, hasításában, így az A $\beta$  fragmens keletkezésében kiemelt szerepet játszik a neurotrofinok és növekedési faktorok aktiválta mitogén-aktivált protein kináz jelátviteli mechanizmus (Desdouits-Magnen és *mtsai*, 1998; Mills és *mtsai*, 1997). További *in vitro* tanulmányok világítottak rá, hogy a szabályozás egy p21Ras-mediálta folyamat (Cosgaya és *mtsai*, 1996; Greenberg és *mtsai*, 1994), melyben a keletkező és szekretált szolubilis  $\beta$ -APP N-terminális fragmens serkenti a mitogén-aktivált protein kináz működését (Greenberg és *mtsai*, 1994).

Tanulmányunkban azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja az Alzheimer-kór korai fázisát jellemző emelkedett szintű p21Ras expresszió a neuronok morfológiáját, inter-neuronális kapcsolatait a felnőtt, differenciálódott központi idegrendszerben. A transzgenikus egérmodell több agyi régiójában végzett kvalitatív és kvantitatív, fény- és elektron mikroszkópos kísérletek rávilágítottak, hogy a p21Ras fehérje döntően

befolyásolja a sejtek morfológiáját, fokozni képes az ingergazdag környezet okozta trofikus, és ellensúlyozni a depriváció okozta alaktani és sejtkapcsolati változásokat.

#### 1.4. Az endokannabinoid rendszer és a szinaptikus működés

Az Alzheimer-kór patomechanizmusában kiemelt szerepet foglal el a szinaptikus működés károsodása, zavara. Az ingerületátvivő anyagok felszabadításának időbeli dinamikáját retrográd jelrendszerek szabályozzák (Alger, 2002), melynek során retrográd jelátvivő molekulák szabadulnak fel a posztzinaptikus oldalról, hogy hatásukat a preszinaptikus struktúrán kifejthessék (Kano és *mtszai*, 2009). Ilyen elven működik az endokannabinoid rendszer, melyet rágcslók (Katona és *mtszai*, 2006), főemlősök (Harkány és *mtszai*, 2005) és ember (Ludányi és *mtszai*, 2011) agyvelejében is azonosítottak. A hippocampusban különösen a 2-arachidonoil-glicerol (Mechoulam és *mtszai*, 1995) bizonyult effektív endokannabinoid szignál molekulának (Gao és *mtszai*, 2010), melyet a posztzinaptikus dendrituskékben halmozódó  $\alpha$  és  $\beta$ -diacilglicerol-lipáz enzimek termelnek (Bisogno és *mtszai*, 2003). A 2-arachidonoil-glicerol a preszinaptikus oldalon található 1-es típusú kannabinoid receptorhoz (CB<sub>1</sub> receptor) kötődik, lebontását a preszinaptikusan található monoacilglicerol-lipáz (Dinh és *mtszai*, 2002) és a pre- és posztzinaptikusan elhelyezkedő szerin hidroláz  $\alpha/\beta$ -hidroláz-domén tartalmú enzim (ABHD6) végzi (Hashimoto-dani és *mtszai*, 2007; Marrs és *mtszai*, 2010). A 2-arachidonoil-glicerolhoz képest alacsony koncentrációban található az agyvelőben a másik azonosított endokannabinoid, az anandamid (Devane és *mtszai*, 1992). Hatását nemcsak kannabinoid receptor mediálta útvonalon képes kifejteni, más, így a tranziens receptor potenciál vanilloid-1-hez (TRPV<sub>1</sub> receptor) is kötődni képes (A. Tóth és *mtszai*, 2009). Szintéziséért az N-acil-foszfatidil-etanolamin specifikus foszfolipáz D (NAPE-PLD), lebontásáért a zsírsav-amid-hidroláz (FAAH) felelős (Cravatt és *mtszai*, 1996; Ueda és *mtszai*, 2005).

Az endokannabinoid ligand megkötése a preszinaptikus kannabinoid receptoron gátolja az ingerületátvivő anyagok felszabadulását. Gátló szinapszis esetén így depolarizáció indukálta gátláscsökkenés (depolarization-induced suppression of inhibition, DSI), serkentő szinapszis esetén pedig depolarizáció indukálta serkentéscsökkenés (depolarization-induced suppression of excitation, DSE) jön létre (Ohno-Shosaku és *mtszai*, 2002; Yoshida és *mtszai*, 2002). A hippocampusban végzett kutatások kimutatták, hogy CB<sub>1</sub> receptorok kolecisztokinin tartalmú gátló interneuronok preszinaptikus membránjában fordulnak elő, működésük kritikus a szinapszisok és neuronhálózatok fiziológiás működésében (Katona és *mtszai*, 2000; Katona és *mtszai*, 1999; Mackie és Katona, 2009).

### ***Endokannabinoidok a neurodegeneratív folyamatok tükrében***

Alzheimer-kórban az endokannabinoidok többféle hatásmechanizmusban is részt vesznek (Bisogno és Di Marzo, 2008). Gyulladásellenes mediátorként csökkentik a mikroglia aktivációját és a citokinek termelését (Halleskog és *mtsai*, 2011; Ramirez és *mtsai*, 2005) valamint antioxidáns hatásúak (Chung és *mtsai*, 2012). Szerepet tulajdonítottak az endokannabinoidoknak az idegsejtek védelmében: a CB<sub>1</sub> receptor-függő mechanizmusok gátlása csökkenti az A $\beta$  előidézte neurotoxicitást és a következményes kognitív képesség csökkenését (Mazzola és *mtsai*, 2003), CB<sub>1</sub> receptor agonisták alkalmazás pedig súlyosbítja a neurodegenerációt (van der Stelt és *mtsai*, 2006).

Munkánkban az Alzheimer-kórban történő endokannabinoid retrográd szignálrendszer változására irányítottuk figyelmünket. Ennek során nyomon követtük a 2-arachidonoil-glicerol metabolikus enzimeinek és fő preszinaptikus receptorának, a CB<sub>1</sub> receptor expressziós mintázatát és annak változásait. Eredményeinket a TRPV<sub>1</sub> receptor és az ahhoz kötődő anandamid metabolizmusáért felelős enzimek vizsgálatával is kiegészítettük.

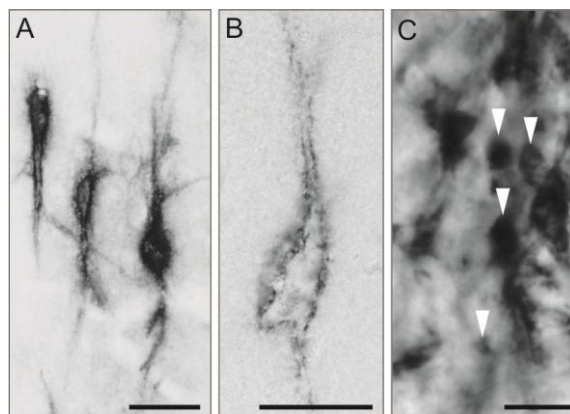
### **1.5. Az extracelluláris mátrix jelenléte a központi idegrendszerben**

Legtöbb szervünk szövetében a sejtek extracelluláris állományba ágyazva találhatók, mely nagyban meghatározza a szövet jellegét. A központi idegrendszerben az extracelluláris mátrix jelenlétét az elmúlt évtizedekig tagadták, az általánosan elfogadott dogma szerint a neuronok és gliasejtek nyúlványaikkal olyan szorosan illeszkednek egymáshoz, mely teljesen beszűkítené a sejtek közötti teret. Az elmúlt húsz év kutatásai rávilágítottak, hogy mind az agyvelőben, mind a gerincvelőben az extracelluláris mátrix, jóllehet rostmentes formában (ti. kollagén-, elasztikus- vagy rácsrost itt nem található), de jelen van, egyes agyterületeken elérheti tömegének 20%-át (Sykova és Nicholson, 2008).

### ***Az extracelluláris mátrix megjelenési formái a központi idegrendszerben***

A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix intenzív kutatások kerettüzetébe került, mind fejlődő, mind differenciált idegrendszeri vonatkozásokban. A fejlődésben többek között az axon növekedési csúcsok válaszkészségét (Ida és *mtsai*, 2006), az idegsejtek ingerelhetőségét (Amet és *mtsai*, 2001; Pizzorusso és *mtsai*, 2002), a sejt felszíni receptorok eloszlását és szignáltranszdukcióját (Dityatev és *mtsai*, 2010; Frischknecht és *mtsai*, 2009) befolyásolják. A differenciált idegrendszerben klinikai kutatások elsősorban a sérülés utáni regenerációban és neuroprotekcióban vizsgálják szerepét (Dityatev és Fellin, 2008; Ferhat és *mtsai*, 1996; Fitch és Silver, 2008).

Neurohisztológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a kémiai összetételében heterogén, többnyire amorf eloszlású extracelluláris mátrix az idegsejtek körül kondenzált formában is előfordul. Klasszikus megjelenési formája a sejttest és proximális dendritek körül lerakódó ún. perineuronális háló („perineuronal net”) (Brückner és *mtsai*, 1993; Hockfield és McKay, 1983), míg a terminális axonszakaszok és szinapszisok körül periszinaptikus gyűrűket („axonal coats”) (Brückner és *mtsai*, 2008; Morawski, Brückner, Jäger, és *mtsai*, 2012) alkothatnak (2A-C ábra). Vizsgálódásaink idején utóbbi képletekről csupán fénymikroszkópos, erősen korlátozott ismeretek álltak rendelkezésre.



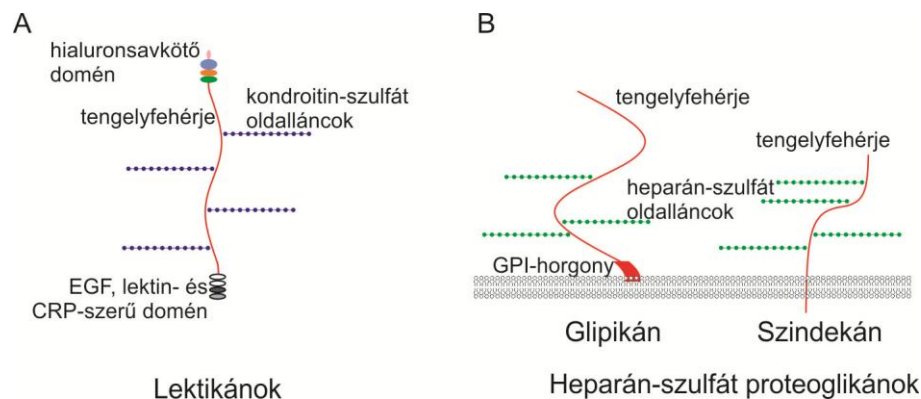
**2. ábra.** CRTL-1<sup>+</sup> perineuronális hálók (A, B) és periszinaptikus hüvelyek (C, nyílhegyek). Lépték: 20  $\mu$ m (A), 10  $\mu$ m (B), 4  $\mu$ m (C).

A perineuronális hálók funkciója mindmáig vita tárgya (Ramón y Cajal műtermékek tekintette őket). A legtöbb gerinces (Brückner és *mtsai*, 1993; Gaál és *mtsai*, 2014; Lander és *mtsai*, 1998; Matthews és *mtsai*, 2002; Ojima és *mtsai*, 1998; Rácz és *mtsai*, 2014), így az ember (Adams és *mtsai*, 2001; Brückner és *mtsai*, 1999; Brückner és *mtsai*, 2008; Morawski, Brückner, és *mtsai*, 2010) központi idegrendszerében azonosíthatók, eloszlása sejttípusonként és területenként nagy variabilitást mutat (Brückner és *mtsai*, 1999; Härtig és *mtsai*, 1999; McGuire és *mtsai*, 1989; Morawski és *mtsai*, 2004). Perineuronális hálókat jellegzetesen gyorstüzelő, parvalbumin tartalmú, GABAerg interneuronok körül találunk, ahol valószínűleg az ionhomeosztázis biztosításában játszanak szerepet (Brückner és *mtsai*, 1993; Härtig és *mtsai*, 1999). Jelentőséget tulajdonítottak ezeknek a periszomatodendritikus mátrix aggregátumoknak a stressz és a degeneratív elváltozások elleni védelemben (Morawski és *mtsai*, 2004; Y. Wu és *mtsai*, 2005), valamint a szinaptikus plaszticitás alakításában (Deák és *mtsai*, 2012; Matesz és *mtsai*, 2005), főképp korlátozásában is (Berardi és *mtsai*, 2003; Kaas és *mtsai*, 2008; Pizzorusso és *mtsai*, 2002). Utóbbira jellemző, hogy az idegsejtek differenciálódásuk és szinapszisaik kiépítése után

halmozzák fel maguk köré a perineuronális mátrixot, korlátozva ezzel további inter-neuronális kapcsolatok létrejöttét. Enzimatis lebonatásukkal az idegsejtek plaszticitása, új szinaptikus kapcsolatok kiépülése növelhető illetve serkenthető (Pizzorusso és *mtsai*, 2002).

### **A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix kémiai összetétele**

A központi idegrendszerben található extracelluláris mátrix gerincét a hialuronsav molekula alkotja, egy hosszú, elágazódás nélküli glükózaminoglikán, melyet sejtfelszíni enzimek, ún. hialuron szintázok termelnek (Weigel és *mtsai*, 1997). Speciális kapcsoló fehérjékkel különböző proteoglikánokat képes kötni, így egy összetett, hálózatos, hidrofil struktúrát kialakítani. A központi idegrendszeri proteoglikánok két legismertebb csoportja a heparánszulfát- és a kondroitinszulfát proteoglikán család (3. ábra).



**3. ábra.** Hialuronsavhoz kapcsolódni képes kondroitin-szulfát proteoglikánok, más néven lektikánok (A) és heparán-szulfát proteoglikánok (B) sémás rajza. **Rövidítések:** **CRP** komplement szabályozó fehérje, **EGF** epidermális növekedési faktor ismétlődő szekvenciák, **GPI** glikozil-foszfatidil-inozitol.

Előbbi csoportba tartoznak a szindekánok, glipikánok és perlekánok népes családjai, melyek az agyvelő sejtfelszíni- (szindekánok), vagy a membránhoz GPI-horgonyzó fehérjével kapcsolódni képes glikoproteinjei (glipikánok). A kondroitinszulfát proteoglikánok egy csoportja, a lektikánok, szintén képesek a hialuronsavhoz kötődni. Ide tartozik a főleg fejlődő idegrendszerben expresszáldó neurokán, a verzikán, valamint az érdeklődésünk középpontjába került aggregán és brévikán. Míg fejlődő idegrendszerben mind a heparánszulfát- mind a kondroitinszulfát proteoglikánok szerepét intenzíven vizsgálták, a differenciálódott központi idegrendszer nélkülözhetetlen építőköveként, struktúrelemeként utóbbiakat méltatták (Cui és *mtsai*, 2013). A molekulák részletes biokémiai jellemzésétől eltekintünk, az általunk vizsgált aggregán és brévikán legfőbb tulajdonságait, szerepüket mindazonáltal szükségesnek látjuk röviden ismertetni.

Az aggregán molekulát eredetileg a porcszövetben azonosították és vizsgálták intenzíven az elmúlt húsz évben (Doege és *mtsai*, 1990). A hialuronsavhoz közvetlen kötődni képes lektikánokhoz tartozik, nagy molekulásúlyú szénhidrátpolimerként könnyen képez aggregátumokat (Viapiano és Matthews, 2006). Jóllehet mind a négy központi idegrendszerben előforduló lektikán fontos szerepet tölt be az extracelluláris mátrix szerkezeti felépítésében, az aggregán kizárólag a neuronok sejtteste és proximális dendritjei közvetlen közelében, a perineuronális hálókban található (Morawski, Brückner, Arendt, és *mtsai*, 2012). Aggregán jelenléte nélkül perineuronális hálók nem épülnek ki (Giamanco és *mtsai*, 2010), termelődésük az agyban térben és időben egyaránt szabályozott módon történik. Patkányban megjelenése és halmozódása leképezi a neuronok kaudokraniális irányú differenciálódási irányát és térképét, expressziójának a felnőttkorban is folytatódó platófázisát a posztnatális 21. napon éri el (Matthews és *mtsai*, 2002; Milev és *mtsai*, 1998). Az aggregán ugyanakkor csak bizonyos típusú – így emlősökben jellegzetesen gyorstüzelő, parvalbumin tartalmú - neuronok körül halmozódik fel (Härtig és *mtsai*, 1994; Härtig és *mtsai*, 1999), glikolizáltsága regionális és sejtspecifikus különbségeket mutat (Matthews és *mtsai*, 2002). A neuronális és szinaptikus differenciálódással összhangban történő szerkezeti kiépülése (Brückner és *mtsai*, 2000; Hockfield és *mtsai*, 1990) irányította figyelmünket a neurodegeneratív betegségekben lehetséges szerepükre.

A brévikán molekula – neve erre utal - a lektikánok legrövidebb tagja, és főként gliasejtek termelik, (Jaworski és *mtsai*, 1995; Yamada és *mtsai*, 1997). Kizárólag a központi idegrendszerben fordul elő, melyre másik nevének rövidítése (BEHAB: Brain-Enriched Hyaluronic Acid Binding protein) is utal (Jaworski és *mtsai*, 1994). Jóllehet perineuronális hálókban előfordul, axon iniciális szegmens körüli specifikus felhalmozódása szelektív kompartmentalizációra utal (Frischknecht és *mtsai*, 2009). Az aggregánhoz hasonlóan intracellulárisan termelődik, expressziója a posztnatális korban indul el és fokozódik, míg el nem éri és stabilizálódik a felnőtt korra jellemző szinten (Yamada és *mtsai*, 1997). Egyensúlyi szerepet tölt be a már kialakult és az újonnan kialakuló kapcsolatok között abban a kritikus időszakban, amelyben az agy különösen érzékeny plasztikus környezeti ingerekre (Morawski, Brückner, Jäger, és *mtsai*, 2012). Figyelmünket a brévikán szelektív eloszlása, plaszticitással kapcsolatos vonatkozásai, végül az a jelenség ragadta meg, hogy neuronok is képesek termelni (Hamel és *mtsai*, 2005; John és *mtsai*, 2006).

Az Alzheimer-kór egyik legfőbb jelensége a sejtközi kapcsolatok, szinapszisok korai és szelektív pusztulása (Selkoe, 2008a, 2008b). A szinapszisok körüli mikrokörnyezetet és mikrostruktúra döntő jelentőségű a szinapszisok megfelelő

működésének, plaszticitásának fenntartásában, biztosításában (Dityatev és Rusakov, 2011; Ganguly és *mtsai*, 2013). Feltételeztük, hogy Alzheimer-kórban fokális periszinaptikus és egyedi kémiai összetételű mátrix lerakódások befolyásolhatják a szinapszisok működését, fennmaradását. Ehhez azonosítanunk kellett ezen periszinaptikus hüvelyek neurokémiai összetételét és morfológiáját. A több fajban végzett fénymikroszkópos, konfokális lézer szkennelés és ultrastrukturális immunhisztokémiai vizsgálatok rávilágítottak ezen struktúrák létezésére, kompartmentalizációjára és sajátosságaira, valamint az Alzheimer-kórban történő változásokban betöltött szerepére.

## 2. Célkitűzések

Doktori értekezésemben az idegsejtek funkcionális anatómiai elváltozásait, kapcsolatainak megváltozásait vizsgáltam Alzheimer-kórban. A különböző transzgenikus egértörzsekben és más kísérletes állatmodellekben, valamint humán mintákon tett vizsgálódásaimmal alábbi kérdéseket kívántam megválaszolni.

1. Az amiloid prékurzor molekula több protein - így az Alzheimer-kór patomechanizmusában kiemelten fontos A $\beta$  fragmens - prékurzor fehérjeje. Több, különböző transzgenikus egérmodellen kívántam a nem amiloidogén és amiloidogén fehérje expresszió *in vivo*, differenciált idegrendszerben kifejtett hatásait megvizsgálni. Figyelmem a betegségben kiemelten sérülékeny kérgi principális neuronok egészének funkcionális-alaki elváltozásaira, inter-neuronális kapcsolataira, valamint a hippocampális sejtproliferációra és differenciálódásra fordítottam. Deprivációs- és ingergazdag környezetben végzett kísérletekkel a fehérje expressziójának hatásait olyan környezeti hatások tükrében kívántam vizsgálni, melyek a betegség progresszióját, ha korlátozva is, de befolyásolni képesek.

2. Az Alzheimer-kórra jellemző kóros tau-(hiper)foszforiláció reverzibilis formáját figyelhetjük meg téli álmat alvó emlősök hibernációs állapotában. Szíriai aranyhörcsögben végzett kísérletekkel kutattam, szinaptikus elváltozásokkal járó kompartmentspecifikus változások történnek-e hibernációban, és kapcsolatban áll-e ez az emléknym elvesztésével.

3. Az Alzheimer-kór korai fázisában a neurotrofinok és növekedési faktorok expressziója növekszik. A szignál transzdukcióban kiemelten fontos szerepet kap a p21H-ras G-fehérje, melynek szintje a betegség korai fázisában emelkedik. Transzgenikus egérmodellben végzett funkcionális anatómiai kísérletekkel céloztam megmutatni, milyen sejtanatómiai és szinaptikus változásokat képes ez a G-fehérje differenciált agykéregben *in vivo*, különböző környezeti kihívások között kiváltani.

4. Az endokannabinoidok a szinaptikus működés fontos szabályozói. Humán mintákon kívántam megvizsgálni, milyen sejtszintű változások történnek Alzheimer-kórban az endokannabinoidok neuronális és gliális metabolizmusában. Kísérleteimben a lebontó enzimek lokalizációjának és expressziójának megváltozására koncentráltam.



5. Emlősökben a szaglórendszer az agy kiemelten plasztikus területe. Humán mintákon új, differenciálatlan neuronpopuláció után kutattunk, mely az Alzheimer-kórban tapasztalt szaglásérzékelés megváltozásában játszhat szerepet.

6. A szinapszis közvetlen környezetét szűk extracelluláris mátrix tér alkotja. Állati- és humán mintákon ezen kritikus terület molekuláris összetételét, Alzheimer-kórban fellépő változását és egy feltételezett szinaptoprotektív hatást kívántam meghatározni illetve bizonyítani.

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1. Állati minták, az állatok kezelése, beavatkozások

##### *Állatok, a használt transzgenikus egerek rövid jellemzése*

Kísérleteinkhez egér (*Mus musculus*), patkány (*Rattus norvegicus*, Wistar), sün (*Echinops telfari*), szíriai aranyhörcsög (*Mesocricetus auratus*), egérmaki (*Microcebus murinus*) és házi csirke (*Gallus domesticus*) agyvelőket használtunk, az állatok pontos fajtáját, nemét és számát az 1. táblázat tartalmazza. Az állatkísérleteket az European Communities Council 1996. november 24-i állatkísérleteket szabályozó direktívája (86/609/ECC) és a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi Tanácsadó Testület Állatügyi Etikai Bizottsága által jóváhagyott (#63/2000) kísérleti protokollja szerint végeztük, amely megfelelt a Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságának Járványügyi és Állatvédelmi Osztálya által kiadott útmutatásoknak.

Az Alzheimer-kórt modellező vizsgálatainkban több transzgenikus egérfajt vizsgáltunk, melyek amiloid prékurzor protein expressziójának szintje, amiloid képzési hajlama különböző volt. Ily módon kerestünk választ arra, hogy a prékurzor molekula, a szolubilis A $\beta$  szint, illetve maga az amiloidogenezis milyen hatással van a kérgi neuronokra.

A B6-Py8.9 transzgenikus egerek generálása során egy, a teljes vad típusú humán amiloid prékurzor proteint tartalmazó mesterséges élesztőkromoszómát (yeast artificial chromosome, YAC) juttattak be R1 embrionális őssejtekbe. A transzgenikus humán fehérjét az agy, valamint a perifériás szövetek is az endogén amiloid prékurzor fehérjéhez hasonló szinten expresszálják (Lamb és *mtsai*, 1993). Több régióban azonosították a transzgén expresszióját, így a legtöbb kortikális régióban, a hippocampus CA1-3 piramissejtjeiben, de a nucleus paraventricularis hypothalamiban és az amygdalában is (Harris-Cerruti és *mtsai*, 2004). Az állatokban detektálhatóak a fehérje APP770, az APP751 és az APP695 izoformái is. Alzheimer-kórra jellemző hisztopatológiai és élettani elváltozásokat az állatok nem mutatnak (Lamb és *mtsai*, 1993).

A PDGF-hAPP<sub>wt</sub> jelű állatokban a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor, PDGF)  $\beta$  lánc neuronális promotor kontrollja alatt valósul meg a humán vad típusú amiloid prékurzor protein molekula expressziója (Mucke és *mtsai*, 2000; Rockenstein és *mtsai*, 1995). A fehérje expresszió kimutatható a neokortexben, hippocampusban, hipotalamuszban és a cerebellumban is, annak szintje az endogén

fehérje szintjének kétszeresét is eléri. Mindezek ellenére az állatokban nem történik amiloid lerakódás a 24. hónapig (Mucke és *mtsai*, 2000).

A Tg2576 egértörzsben egy hörcsög prion fehérje kozmid vektor kontrollja alatt történik a „svéd kettős mutáns” (Swedish double mutation) tartalmazó hAPP695 expressziója (Hsiao és *mtsai*, 1996). Ennek köszönhetően az A $\beta$ 40 fragmens szintje ötszörösére, az amiloidképződést nagyban elősegítő A $\beta$ 42 fragmens szintje tizennégyszeresére nő, kilenc hónapos állatokban pedig a kortikális és limbikus struktúrákban amiloid plakkok keletkeznek nagy számban, melynek következménye viselkedés- és memóriazavarokban (Hsiao és *mtsai*, 1996) is jelentkezik.

Egy másik egértörzs egyedei a p21H-Ras<sup>Val12</sup> transzgént expresszálják. Az állatok generálása során a humán Ha-Ras transzlációra nem kerülő 5' régió és a patkány szinapszin 1 génjeit fuzionálták. A Ha-Ras gén 3' flanking régióját – a poliadenilációs szignált is beleértve, eltávolították és egy belső riboszomális entry site/LacZ szekvenciával helyettesítették. Ezzel egy, a vektor szekvencia nélkül 10,1 kb hosszú lineáris DNS fragmentum keletkezett, ami alkalmas volt egér embriókba való bejuttatásra. Az idegsejtspecifikus expressziót így a szinapszin 1 promotor kontrollja biztosítja, a neuronok egyúttal egy reporter gént ( $\beta$ -galaktozidázt) is expresszálhatnak, mely egyértelművé teszi azok azonosítását. A transzgén expressziója a posztnatális 14. naptól emelkedik számottevően, a 40. napon az endogén fehérje szint ötszörösét is eléri, ennek tükrében a hatások már egy nagyban differenciálódott idegrendszerben jelentkeznek (Heumann és *mtsai*, 2000). A transzgént a piramissejtek expresszálják, más neuronokban csak elszórtan jelentkezik a hatás (Heumann és *mtsai*, 2000).

A felhasznált állatok egy részén beavatkozásokat végeztünk a transzkardiális perfúzió előtt. Egereken végzett kísérletek esetén azonos számú és azonos egértörzsű alomból származó transzgenikus és vad típusú állatokat használtunk.

#### *Bajuszszőr eltávolítás*

A B6-Py8.9 (10 állat), Tg2576 (10 állat) és p21H-Ras (18 állat) törzsek egyedein bajuszszőr eltávolítást (vibrisszekтомиát) végeztünk. Az állatokban vagy az összes egyik oldali bajuszszőrt (B6-Py8.9 és Tg2576 egerek) vagy az egyik oldali B és D sorok bajuszszőreit távolítottuk el. A beavatkozást altatásban végeztük, izomba adott 100mg/ttkg ketamin, 5mg/ttkg xylazin és 0,1mg/ttkg atropin keverékével. A bajuszszőröket csipesszel eltávolítottuk (kihúztuk). Az állatok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd a corpus callosumba az „*In vivo sejtfeltöltés*” című alfejezet alatt ismertetett módon biotinilált dextrán amin (BDA) retrográd pályakövető anyagot (Zayats és *mtsai*, 2002) juttattunk, melyet a komisszurális piramissejtek az ellentétes oldalon felhalmoztak. Egy héttel később az állatokat transzkardiálisan

perfundáltuk, az agyvelőt eltávolítottuk (ld. „Az agyvelő fixálása és metszése” című alfejezet).

#### *Önkéntes fizikai aktivitás biztosítása*

Ezeket a kísérleteket a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> (20 állat) és a p21H-ras (20 állat) egereken végeztük. Az állatok ketrecébe futókereket helyeztünk, melybe az állatok bármikor, akarataukban nem korlátozva bemehettek és futhattak. A kontroll állatok ketrecébe nem helyeztünk futókereket.

#### *Ingergazdag környezetben tartott állatok*

Negyven, hat hetes PDGF-hAPP<sub>wt</sub> egeret helyeztünk nagyméretű ketrecekbe (80x75x87 cm). A ketrecekben műanyag csöveket, futókerekeket, alomépítésre alkalmas anyagokat, nyílással bíró dobozokat helyeztünk, több szintre helyezve azokat. Az állatok négy hétig éltek ezen a helyen. A kontroll állatokat standard állatházi ketrecekben tartottuk.

#### *Újonnan született idegsejtek (neurogenesis) vizsgálata – 5-bróm-2'-deoxiuridin (BrdU) injekciók*

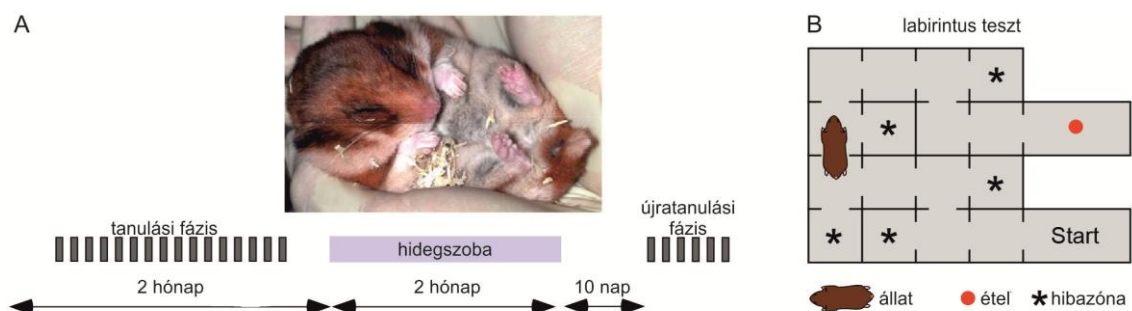
Összesen huszonkettő darab, kettő, három, öt és hét éves sündisznóba, valamint negyven, hathetes PDGF-hAPP<sub>wt</sub> egerbe altatás nélkül juttattunk be intraperitoneálisan BrdU-t (50µg/ttg napi dózisban, 100µl térfogatban)(Franke és *mtsai*, 2004). A sündisznók hét, az egerek tizenegy napon keresztül kaptak naponta injekciót. A kezelés végén a sündisznókat transzkardiálisan fixáltuk (ld. az „Az agyvelő fixálása és metszése” című alfejezet), az egereket normál állatházi körülmények között vagy ingergazdag környezetben egy, vagy 28 napig hagytuk túlélni a fixálás előtt.

#### *Hibernációs kísérletek*

Hibernációs kísérleteinket szíria aranyhörcsögökön (*Mesocricetus auratus*) végeztük (4. ábra). Az állatokat 4-8 hétig 23-26 °C-on tartottuk 8:16 órás fény-sötétség ciklusban, majd 4-8 hétig 5-7 °C-on 4:20 órás fény-sötétség ciklusban. Az állatok mozgását infravörös detektorral követtük, mellyel a hibernáció tényét a fizikai inaktivitás alapján megállapíthattuk. Több kísérleti csoportot képeztünk. Állatokból a hibernációs periódus korai (8 óra) vagy késői (36-48 óra) szakaszából, továbbá az ébredés utáni korai (2,5 óra) és késői (24-36 óra) szakaszából is vettünk mintákat, azok külön kísérleti csoportot alkottak. Az eutermiás állatok nem mutattak a hibernációra utaló mozgás inaktivitást.

*Labirintus teszt*

Ebben a kísérletben 40 hím hörcsögöt használtunk. Az állatokat egy 15cm magas, 45x45 cm széles dobozba helyeztük, melyet 16 részre osztottunk. Egyes falakon 6cm széles nyílások voltak, melyeken az állat átbújhatott (4. ábra). Az induló pozícióból a cél pozícióba egy legrövidebb úton lehetett eljutni, amely mentén öt zsákutcába is kerülhetett az állat. Az állatok mozgását egy kisméretű infravörös-kamerával követtük nyomon. Rögzítettük az induló pozícióból a célba éréshez szükséges idő hosszúságát és a zsákutcába kerülések számát, amit hibának neveztünk. Az állatot célba kerülésekor élelemmel jutalmaztuk (food reward).



**4. ábra.** Szíriai aranyhörcsögön végzett tanulási kísérlet magyarázó ábrája. Két hónap tanulási fázis után az állatok 2 hónapra hidegszobába kerültek, melyet 10 nap után szobahőmérsékleten egy rövid újratulási fázis követett (A). A kísérleti állatok egy erre a célra készített labirintusban kellett megtalálják a célt (B).

A szíria aranyhörcsög fogságban éjszakai aktivitást mutat, ezért azokat négy hónapig fordított ciklusban (16:6 órás fény-sötétség ciklus) tartottuk. A tanulási fázis 15 alkalomból állt, 15 egymást követő napon, az állat aktív idejében. Ezután 13 állatot 23-26 °C-on, 27 állatot pedig 5-7 °C-on tartottunk 20:4 órás fény-sötétség ciklussal 12 hétig. A 27 állatból 12 hörcsög hibernáció jelét mutatta, 14 nem, 1 állat elpusztult. A 12 hét elteltével az összes állatot 25 °C-on tartottuk 10 napig, és 6 újratulási alkalmat biztosítottunk.

*In vivo sejtfeltöltés*

A BDA pályakövető anyag mind retrográd, mind anterográd irányban szállítódik. Ezekben a kísérletekben előbbi tulajdonságát használtuk fel. Az egereket mély altatásban sztereotaxiás készülékre helyeztük, fejét rögzítettük, majd fejbőre alá helyi érzéstelenítésként 0,1 ml Xylonest injekciót adtunk (Astra-Zeneca GmbH, Wedel, Germany). A kérgestestbe Hamilton fecskendő segítségével juttattuk a nagy mennyiségű pályakövető anyagot (1µl, 20%; koordináták: az agyfelszíntől ventrálsan 1mm, a Bregmától 1,7mm kaudálisan, a középvonaltól 1mm-re laterálisan) Franklin és

Paxinos sztereotaxiás atlasza alapján (Franklin és Paxinos, 1997). Az állatokat egy héttel később perfundáltuk, ez idő alatt az injekcióval ellentétes oldalon számos kommisszurális piramissejt oly mértékben halmozta fel magában a pályakövető anyagot, mely a hisztokémiai reakció után a teljes dendritfa megjeleníthetőségét lehetővé tette, legtöbb esetben a dendrittűskék helyét és alakját is megbízhatóan azonosítani tudtuk.

#### *Anterográd pályakövetés*

A narkózist ketamin (100 mg/ttkg), xylazin (5mg/ttkg) és atropin (0,1 mg/ttkg) elegyével biztosítottuk. Az állatot sztereotaxiás készülékre helyeztük, fejét rögzítettük, majd fejbőre alá helyi érzéstelenítésként 0,1 ml Xylonest injekciót adtunk. A célzott terület feletti csontállományt fogorvosi fúróval eltávolítottuk, majd Hamilton fecskendő segítségével biotinilált dextrán amint (0,3 µl 20 %-os BDA, 10.000 MW, Molecular Probes, Eugen, OR, U.S.A.) juttattunk a nucleus sensorius principalis nervi trigeminibe, tájékozódáshoz Paxinos és Watson sztereotaxiás atlaszát (Paxinos és Watson, 1998) használtuk. A műtétek után két héttel az állatokat a már ismertetett módon fixáltuk, agyukat eltávolítottuk, majd metszettük.

#### *Saporin-konjugált vezikuláris GABA transzporter ellenes antitest in vivo alkalmazása*

Összesen 10 egérnek és 10 patkánynak 2µl (0,5mg/ml) saporin-konjugált vezikuláris GABA transzporter ellenes antitestet vagy nemkonjugált vezikuláris GABA transzporter ellenes antitestet juttatunk mély altatásban bal hippocampuszuk dorzális részébe. A műtétet a fent leírtakhoz hasonlóan, mély altatásban és helyi érzéstelenítésben végeztük (koordináták egérben: az agyfelszíntől ventrálisan 1,6mm, a Bregmától 1,5mm kaudálisan, a középvonaltól 1,8mm-re laterálisan, Franklin és Paxinos sztereotaxiás atlasza alapján (Franklin és Paxinos, 1997); koordináták patkányban: az agyfelszíntől ventrálisan 3mm, a Bregmától 4,3mm kaudálisan, a középvonaltól 3,5mm-re laterálisan Paxinos és Watson sztereotaxiás atlasza alapján (Paxinos és Watson, 1998)). Az állatok agyát 12 nap után távolítottuk el immunhisztokémiai analízis céljából transzkardiális perfúzió után.

### **3.2. Humán minták**

Az emberi szövetmintákat a Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézete bocsátotta rendelkezésünkre, azok felhasználása a Semmelweis Egyetem etikai engedélyével történt. Mintáinkat olyan elhunytakból kaptuk, akik kórtörténetükben neurodegeneratív betegség jelét nem mutatták.

Az extracelluláris mátrix proteoglikánjainak szénhidrát oldalláncai a halál beállta után bomlásnak indulnak, mely rontja a mátrix molekulák lektinhisztokémiai és immunhisztokémiai megjeleníthetőségét. Ennek megfelelően olyan szöveteket dolgoztunk fel, melynek posztmortem ideje (postmortem delay, PMD, a halál beállta után eltelt idő a fixálás megkezdéséig) 20 óra alatt volt. Agymintáinkat egy 15 és egy 18 óra PMD idejű tetemből, gerincvelő mintáinkat egy 12 és egy 15 óra PMD idejű tetemből nyertük.

Alzheimer-kórban elhunytakból nyert és megfelelő kontroll mintáinkat (egyező korú, neurodegeneratív kórképpen nem szenvedő idős emberekből) a Newcastle Egyetem Agybankjából (Newcastle Brain Tissue Resource) kaptuk. A felhasznált minták adatait a 2. táblázat tartalmazza.

### 3.3. Az agyvelő fixálása, metszése

Az állatokat Ketaminnal elaltattuk (300mg/ttkg), ezután fiziológiás sóoldattal (0.9 %-os NaCl oldat), majd 4% paraformaldehidet és 0,1 % glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M-os foszfát puffer (0,1M PB, pH 7,4) oldatával transzkardiálisan perfundáltuk. Elektronmikroszkópos feldolgozás esetén a glutáraldehid tartalma a fixálóban 2% volt. Az agyvelőket azonnal eltávolítottuk, éjszakára glutáraldehidet nem tartalmazó fixáló elegyben hagytuk, fagyasztva metszés esetén éjszakára 30%-os szacharóz oldatba helyeztük krioprotekció céljából.

Fény- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokra szánt mintáinkból kriosztát segítségével 30, 40 vagy 50  $\mu$ m vastag koronális metszeteket készítettünk, minden hatodik metszetet együtt tároltuk, a született szériákat egyazon immunhisztokémiai- vagy lektinfestésre dolgoztuk fel. Hosszabb idejű tárolás esetén a metszeteket 0,1% Na-azidot tartalmazó 0,1M PB-ben tároltuk. Elektronmikroszkópos feldolgozás esetén az agyat 50  $\mu$ m vastagon, vibratómmal metszettük. A Cavalieri-féle becslésre használt agyvelőket 2%-os agaróz gélbe ágyaztuk, azokból vibratómmal 110  $\mu$ m vastag szeleteket készítettünk.

Félvékony metszetek készítésekor az 50 mikrométer vastag metszeteket a sikeres immunreakció után (VGLUT1, VGLUT2, VGAT) 0,1%-os ozmium-teroxiddal kezeltük 1 óráig szobahőmérsékleten, majd azokat 0,1M PB-vel mostuk (3x20 perc), acetonsorban dehidráltuk, Durcupanba ágyaztuk, majd a blokkokból ultramikrotómmal 1  $\mu$ m vastag szeleteket készítettünk.

Humán agy- és gerincvelő mintáinkat szintén az érpályán keresztül fixáltuk *in situ*. Az artériás és vénás rendszerbe (arteria carotis interna, arteria vertebralis, sinus sagittalis superior) illetve a gerincvelő esetén a szubarachnoideális térbe vezetett

kanülön keresztül fiziológiás sóoldattal (0,9% NaCl), majd 2% paraformaldehidet és 2% glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M PB-vel (pH 7,4) perfundáltuk.

Az agyvelőből a hippokampusz formációt és a külső térdestestet tartalmazó blokkot vágtuk ki mindkét oldalon. A gerincvelőből 15 mm vastag, haránt síkú szakaszokat távolítottunk el a nyaki, mellkasi, ágyéki és keresztcsonti szelvényekből (a tájékozódásban az azonosított ideggyökök nyújtottak segítséget). A mintákat 2% paraformaldehidet tartalmazó 0,1M PB oldatában 4 napig utófixáltuk 4 °C-on.

### 3.4 A metszetek kezelése, képalkotás

#### *Immunhisztokémia*

A metszeteket 0,1M PB oldatával hosszasan (legalább 4x20 perc), majd 0.3%-os Triton-X 100-at tartalmazó PB-vel (0,3%Triton-PB) kezeltük 60 percig, hogy az antitestek penetrációját elősegítsük. A nemspecifikus antitest kötés elkerülése érdekében a metszeteket 5%-os normál szarvaszérumot tartalmazó oldatba tettük egy órára szobahőmérsékleten (a későbbiekben használt szekunder antitesteket szarvasban termelték). A metszeteket éjszakán át szobahőmérsékleten, vagy két napig 4 °C fokon reagáltattuk a primer antitesttel, melyet 0,3%-os Triton-PB-ben oldottunk. Többszörös jelölés esetén olyan primer ellenanyagokat alkalmaztunk, melyeket különböző fajokban termeltek, azokat ugyanazon oldatban (koktélaban) helyeztük fel. Az alkalmazott primer antitestek listáját a 3. táblázat tartalmazza. Ezt követően a metszeteket 0,1M PB-ben szobahőmérsékleten újból mostuk (legalább 3x20 perc), majd a primer antitesteknek megfelelő, szarvasban termelt szekunder ellenanyagokkal inkubáltuk szobahőn két órán át, melyeket 2% marha szérum albumint (BSA) tartalmazó 0,1M PB-ben oldottunk. Fénymikroszkópos feldolgozás esetén biotinilált, fluoreszcens képalkotás esetén karbocianinnal konjugált, nyúl-, egér-, patkány- vagy kecskeelleni szekundér ellenanyagokat alkalmaztunk (Jackson ImmunoResearch, U.S.A). Elektronmikroszkópos feldolgozás esetén oldatainkban Tritont nem használtunk.

Fénymikroszkópos vizsgálódásra szánt metszeteinket ismételt mosás után (legalább 3x20 perc, 0,1M PB) egy órával korábban elkészített avidin-biotin komplexszel reagáltattuk egy órán át, szintén szobahőmérsékleten (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, 1:1000 0,1M PB-ben oldva). Az immunprecipitátumot nikkel-ammónium-szulfáttal felerősített (0,05%, Merck, Darmstadt, Németország) 3,3'- diaminobenzidin segítségével tettük láthatóvá (DAB, Sigma, St. Louis, MO, 0,025%). Mindez más kémhatású (pH 8,0) 0,1M PB oldatban,



0,001%-osra hígított hidrogén peroxid jelenlétében történt; más esetben Peroxidáz-KIT-et használtunk (VECTOR, SK-4100, Burlingame, CA, U.S.A.).

#### *Lektinhisztokémia*

A metszeteket 0,1M PB-ben alaposan mostuk (legalább 4x20 perc), majd 2% BSA-t tartalmazó 0,1M PB-ben inkubáltuk egy órán át. Ezt követően biotinilált lektinek oldatával (3. táblázat) kezeltük mintáinkat szobahőmérsékleten egy éjszakán át, majd a fentiekkel azonos módon elkészített avidin-biotin komplexszel reagáltattuk egy órán át. A precipitátumot szintén nikkell-ammónium-szulfáttal felerősített 3,3'-diaminobenzidin segítségével tettük láthatóvá 0,05 M-os TRIS-pufferben 0,001%-osra hígított hidrogén peroxid jelenlétében.

#### *X-gal hisztokémia*

A metszeteket X-gal mosópufferrel mostuk (0,1M nátrium-foszfát puffer, pH 7,4, 2mM magnézium-klorid, 5mM etilén-glikol-tetraacid, 0,01% nátrium-deoxikolát, 0,02% Nonidet P-40; 2x7 perc), majd 37 °C-on X-gal festékekkel (mosópuffer + 5mM kálium-ferrocianid, 5mM ferricianid, 1mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid) festettük. A metszeteket ezután a mosópufferrel újból mostuk (2x7 perc), majd tárgylemezre felhúztuk.

#### *Golgi impregnáció*

A paraformaldehiddel transzkardiálisan fixált agyból a telenkefalont blokkban kivágtuk, majd Bubaite szerint impregnáltuk (Bubaite, 1929). A blokkokat alábbi oldatokba helyeztük egymást követően: 24 óráig 36 °C-on 2,5%-os kálium-bikromát oldatba, 24 óráig 36 °C-on 3,5%-os kálium-bikromát oldatba, 48 óráig 36 °C-on 2%-os ezüst-nitrát oldatba, 30 percig szobahőmérsékleten 70%-os etanolba, 1 óráig 36 °C-on etanol-aceton 1:1 arányú keverékébe, végül 10 percig szobahőmérsékleten éter-etanol 1:1 arányú keverékébe. Ezt követően a blokkokat 2%-os celloidinbe helyeztük 5 órára szobahőmérsékleten, 4%-os celloidinba 24 órára 4 °C-on, majd 24 órára szobahőmérsékleten 12%-os celloidinba ágyaztuk szaturált klorofomgőzben. Az impregnált blokkokból számkás mikrotómmal 150  $\mu$ m vastag metszeteket készítettünk, azokat tárgylemezre felhúztuk, etanolban dehidráltuk, 5 percig éterrel kezeltük, majd DePeX-szel lefedtük.

#### *Egysejtfeltöltés fixált szeleten*

Transzkardiális fixálás után az agyat eltávolítottuk, vibratómmal 300  $\mu$ m vastag szeleteket készítettünk, majd a Bregmától 3-4,5 mm-re kaudálisan található régióból a hippocampusz dorzális CA1 piramissejtjeit iontoforézis segítségével Lucifer Yellow (LY,

Sigma, St. Louis, MO) festékekkel feltöltöttük. A szeleteket 5 percre ethidium-bromid oldatába (0,001%), majd egy 0,1M PB-t tartalmazó injekciós kamrába helyeztük. Az elmozdulás megelőzése végett a metszetre egy fémrácsot helyeztünk, melynek húrjai között a célterület megközelíthető maradt. Filamentummal bíró boroszilikát kapillárisokból mikropipettákat húztunk (GC150TF-7.5, Clark Capillaries, Harvard Apparatus, Ltd.), majd hátulról („backfill”) 5%-os LY oldattal feltöltöttük őket. A piramissejteket jellegzetes rétegbeli helyzetük és alakjuk alapján azonosítottuk. A mikropipettát mikromanipulátor segítségével, kettősszűrővel bíró mikroszkóp alatt (ezzel egyszerre láthattuk az ethidium-bromid kirajzolta sejtmembránokat és a mikropipetta végét) a piramissejek sejttestébe vezettük, majd maximum 10 percig, 0,5 másodperces negatív árampulzussal (1Hz) a sejteket feltöltöttük. A metszeteket ezután egy órára 4%-os paraformaldehid fixáló oldatba helyeztük, majd a felhúzás és lefedés előtt 0,1M PB-vel röviden (2x10 perc) mostuk.

#### *Metszetek felhúzás, lefedése, képalkotás*

Ismételt mosások után (legalább 4x20 perc 0,1M PB, pH 7,4) a metszeteket zselatinozott tárgylemezre felhúztuk, száradás után azokat DePex-el (Fluka, Dánia) lefedtük. Azokban az esetekben, amikor a későbbiekben pontos egymásmellettséget vagy kolokalizációt kis (<1  $\mu\text{m}$ ) struktúrában (pl. axon terminális) vizsgáltunk, a metszeteket felhúzás után víz alapú fedőanyagba (DAKO Fluorescent mounting medium) ágyasztuk be és fedtük le. Cavalieri-féle térfogat becslés esetén a vibratómmal készült, 110  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket toluidinkékkel 10 percig (0,1%, Merck, Darmstadt, Németország) festettük szobahőmérsékleten, desztillált vízben kimostuk, tárgylemezre helyeztük, majd azonnal lefedtük.

A DAB-reakcióval megjelenített immunperoxidáz jelölt metszeteket fénymikroszkóp (NIKON ECLIPSE, vagy ZEISS Axiovert 200) segítségével vizsgáltuk. A többszörös immunjelöléssel illetve pályakövetéssel kombinált kettős immunjelöléseket epifluoreszcens mikroszkóppal vagy konfokális lézer szkennig mikroszkóppal (NIKON-BIORAD vagy ZEISS LSM700) végeztük. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkat ZEISS 912 Omega vagy JEOL1200 EMX berendezéssel végeztük. A mennyiségi analízisben használt számítógéppel vezérelt vagy ahhoz kapcsolt mikroszkópokat a megfelelő fejezetben ismertetjük.

### 3.5. Mennyiségi analízisek

#### *Kérgi régiók térfogatának meghatározása*

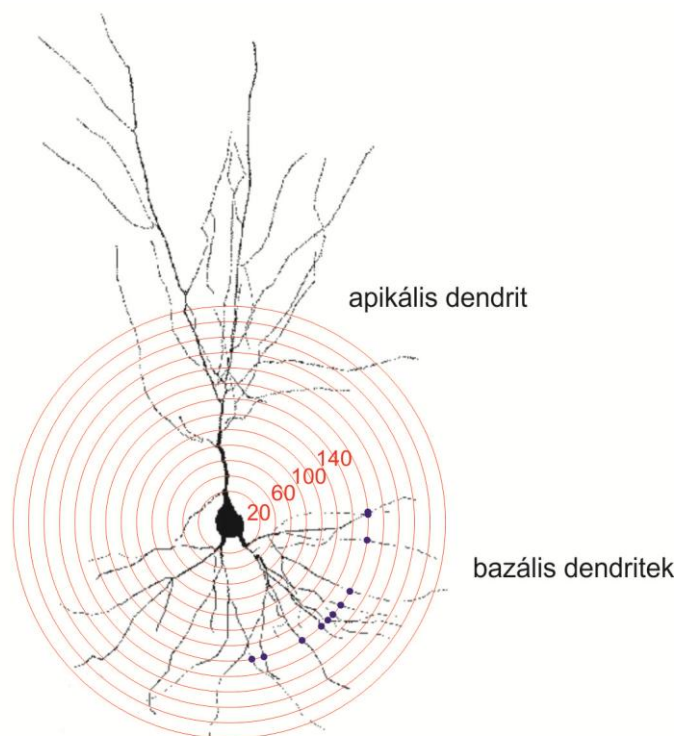
A toluidinkékkel festett 110  $\mu\text{m}$  vastag metszeteken a primer szomatoszenzoros kéreg és a hippocampusz térfogatát a Neurolucida rendszerrel együtt működő Stereoinvestigator alkalmazással, a Cavalieri-féle térfogatbecslés elve alapján (Gundersen és Jensen, 1987) határoztuk meg. Egymást meghatározott távolságban követő szériametszeteken kijelöltük a célrégió területét, amiből a program kiszámította a terület térfogatát.

#### *Piramissejtek térbeli leképezése*

Az *in vivo* vagy fixált szeleten feltöltött, majd fény- vagy fluoreszcens hisztokémiával láthatóvá tett sejteket a Neurolucida programmal (MicroBrightField, Inc.) képeztük le. A számítógépes szoftver segítségével a képernyőn láthatjuk és követhetjük a mikroszkópban (ZEISS) beállított struktúrát. Motorizált tárgyasztal teszi lehetővé a pontos pozicionálást és a képernyőn rajzolt struktúra alaki és helyzeti követését mindhárom síkban. A Z sík követése fénymikroszkópos metszetek esetén manuálisan (mikrométer csavar), fluoreszcens metszetek esetén széria Z-stack felvételeken történt (a program az egymást követő síkokat a térben kezelni tudja, azok léptethetők). A rekonstrukció során a sejttesten kívül a teljes apikális és bazális dendritfa arborizációját lerajzoltuk, a dendrittüskék helyét megjelöltük. A Z tengely mentén meghatároztuk a zsugorodást (300%), amit a program segítségével korrigáltunk (az X és Y tengely mentén nem korrigáltunk, itt a zsugorodás 10% volt). Vizsgálataink célja különböző csoportú állatokból (transzgenikus vs. vad típusú, kezelt vs. megkímélt) leképezett sejtek paramétereinek összehasonlítása volt, így abszolút értékek meghatározását szériametszeteken nem végeztük el – erre az alkalmazott módszerek megbízható lehetőséget nem is nyújthattak volna).

A leképezett sejtek paramétereit a Neuroexplorer program segítségével határoztuk meg. Meghatároztuk 1) a sejttest kerületét és metszeti felszínét, 2) a bazális dendritszegmensek számát, kanyargósságát, hosszát, átlagos és alapi átmérőjét, felszínét és térfogatát elágazódásuk utáni rendjük (primer, szekunder, terciér stb.) szerint, 3) az apikális dendritek dendrittörzsének, oldalfácskáinak és végarborizáció ágainak hasonló paramétereit, 4) a dendritfákat körülölelő kúppalást felszínét és térfogatát (convex hull analysis). Sholl analízis (5. ábra) segítségével az apikális és bazális dendrit arborizáció globális paramétereit jellemeztük (Sholl, 1950). A sejttest középpontjától mért különböző távolságokban meghatároztuk a dendritszegmensek számát és hosszát, az elágazódási pontok és dendritvégek számát. A megadott

értékek a 10  $\mu\text{m}$  széles sávradiuszokra vonatkoznak (tehát a 80  $\mu\text{m}$ -hoz tartozó érték a 70 és 80  $\mu\text{m}$  között azonosított struktúrák számát tükrözik).



**5. ábra.** A piramisneuron dendrit arborizáció elemzéséhez használt Sholl analízis sémás rajza. A sejttesttől mért különböző távolságok közötti sávradiuszokban meghatároztuk a dendritszegmensek számát, hosszát vagy a dendritelágazódások és dendritvégek számát. A lila pontok a jobb oldali bazális dendrit 160  $\mu\text{m}$  sávradiuszban talált dendritszegmenseket (illetve azok számát) jelöli.

#### *Sejttestek kvantitatív analízise*

A p21H-Ras egerekben GABA<sup>+</sup>, parvalbumin<sup>+</sup>, calbindin<sup>+</sup> és calretinin<sup>+</sup> sejtek sejttestének átmérőjét és egységnyi területre eső számát (sűrűségét) a VIDEOPLAN rendszerrel (KONTRON Elektronik) határoztuk meg. A commissura anterior és a hippocampusz rostrális pólusa között minden ötödik 30  $\mu\text{m}$  vastag metszeten megszámoltuk a primer szomatoszenzoros régióban az immunoreaktív sejteket azonos nagyságú (62000  $\mu\text{m}^2$ ) területen. A mérőkeret a kéreg teljes vastagságára kiterjedt. Ugyanebben a munkafolyamatban megmértük a sejttestek két, egymásra merőleges átmérőjét, melynek később átlagával számoltunk.

Ugyanezen egértörzsben a hippocampusz CA1-3 régió piramisneuronjainak és a gyrus dentatus szemcseseuronjainak térfogatát és numerikus denzitását sztereológiai módszerrel határoztuk meg (Gundersen, 1986), 1% osmium-tetroxiddal oszmitifikált metszetekből készült félvékony, toluidinkékkel festett metszeteken. A két egymást követő metszet („reference section and look up section”) távolságát 3  $\mu\text{m}$ -ben ( $h$  érték)

határoztuk meg. A metszetekről felvételeket készítettünk (ZEISS AxioCam HRC-AxioVision 3.1), az idegsejtek analízisét  $100\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  nagyságú keretben végeztük. A független mintavételt („unbiased sampling”) West módszere alapján végeztük (West, 1999).

Sündisznóban a BrdU<sup>+</sup> és DCX<sup>+</sup> sejtek számát a cél régiókban (neokortex, paleokortex, hippocampus és bulbus olfactorius) a Neurolucida rendszer segítségével számoltuk meg ismert nagyságú, kijelölt mérőkeretben. A 2, 3, 4 és 7 éves sündisznókban állatonként és régióként hat metszeten végeztünk méréseket.

PDGF-hAPPW<sub>1</sub> törzű egerekben 1 nappal és 4 héttel az injekció után számoltuk meg a BrdU<sup>+</sup> sejteket a szemcsesejtek rétege mentén a szubgranuláris rétegben, a Neurolucida rendszer segítségével kijelölt és megállapított hosszú szakaszokon. A két különböző időpontban mért értékek különbsége az újonnan született és túlélő sejtek számát határozta meg.

#### *A szinaptikus profilok, boutonok fénymikroszkópos kvantitatív analízise*

A VGLUT1<sup>+</sup> és VGLUT2<sup>+</sup> és VGAT<sup>+</sup> profilok egységnyi területre eső számát (sűrűségét) a szomatoszenzoros kéreg II/III. és IV. rétegében határoztuk meg. Standard beállítással egy ülésben 50 felvételt készítettünk kísérleti csoportonként és immunreakciónként egy mikroszkóhoz csatlakoztatott digitális kamerával (AxioCam HRC – AxioVision 3.1). A képeket az UTHSCSA képanalízis szoftverben (UTHSCSA Image Tool 3.0, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas) megnyitottuk, majd egy  $6670\ \mu\text{m}^2$  nagyságú mérőkeretben automatikusan megszámláltuk. A VGAT<sup>+</sup> profilok számát periszomatikusan is meghatároztuk: a félvékony metszeteken a VIDEOPLAN rendszerrel megmértük a sejtestet területét, amely mentén megszámláltuk az immunoreaktív profilokat.

A kolin-acetiltranszferáz (ChAT)<sup>+</sup> és tirozin hidroxiláz (TH)<sup>+</sup> profilokat nem tudtuk automatikusan megszámlálni, mert nemcsak a boutonok, hanem a köztes axonszakaszok is immunoreaktívak voltak. Ezeket a profilokat a Neurolucida szoftver segítségével számoltuk meg manuálisan  $2380\ \mu\text{m}^2$  nagyságú mérőkeretben.

A nucleus ventralis posteriolateralis thalamiban található tüskés neuronokon („spiny stellate cells”) a dendrittüskék sűrűségét határoztuk meg. Ehhez a Golgi-impregnált metszeteket használtuk, kísérleti csoportonként húsz sejt dendritfáit rekonstruáltuk a dendrittüskék helyzetének pontos megjelölésével a Neurolucida rendszer segítségével. A dendritszakasz hossza és a rajta található dendrittüskék számának ismeretében meghatároztuk a dendrittüskék sűrűségét a dendritszakaszok mentén.

*Elektronmikroszkópia, kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatok (sztereológia)*

A natív vagy immunreakció utáni, vibratómmal készült 50µm vastag metszeteket 0,1M PB-ben mostuk (3x20 perc), a primer szomatoszenzoros kérget kivágtuk, majd szobahőmérsékleten egy óráig 1 %-os ozmium-tetroxiddal kezeltük, Durcupanba ágyasztuk. Kvalitatív vizsgálat esetén 40 nm vékony szeleteket készítettünk ultramiktótóm segítségével.

Mennyiségi analízis esetén a II/III. réteget toluidinkékkel festett félvékony metszeteken különítettük el a sejtestben nagyon szegény I. réteg és nagyon gazdag IV. réteg között. A blokkokat ennek megfelelően újrafaragtuk, majd ultramiktómmal metsztük (40 nm). Blokkonként hat gridre szériametszeteket vettünk fel szalagszerűen. Két szomszédos metszeten („reference section and look up section”) azonos területeket fényképeztünk 5000x-es nagyításon, a negatívokat 20000x-es végnagyításra hívtuk. Szinapszisként határoztuk meg azt az elemet, melynek preszinaptikus oldala legalább három vezikulát tartalmazott és posztzinaptikus eleme membrán megvastagodást mutatott (Mayhew, 1979, 1996). A szinapszisokat és a többszörös szinapszisokat (multiple synaptic boutons, MSB) 392 µm<sup>2</sup> nagyságú mérőkeretben azonosítottuk, numerikus denzitásukat az itt nem részletezett diszektor sztereológiai módszerrel határoztuk meg (Sterio, 1984).

*Statisztikai módszerek*

A morfológiai paraméterek mennyiségi analízise egy- vagy többszempontos variancia analízissel (multifaktoriális ANOVA), a neuronális kompartmentek vizsgálata ismételt méréses varianciaanalízissel történt. A post-hoc analízis Student T-próbával vagy Bonferroni T-próbával történt. Korrelációs analíziseinket a lineáris regresszió módszerével végeztük.

A hörcsögök labirintus tesztjében nyert eredményeket egy nemlineáris kevert modellel tanulmányoztuk (Young és *mtsai*, 2009). A variancia-stabilizációhoz a hibaalkalmak Anscombe-féle transzformációját ( $e' = 2 \cdot \sqrt{e + 3/8}$ ) és a feladat elvégzéséhez szükséges teljes idő logaritmikus transzformációját ( $t' = \log(t/s)$ ) végeztük el. A tanulási görbéket az  $e' = A \cdot 2^{-(i-1)/B} + C$  képlet alapján végeztük, ahol  $i$  az alkalom sorszáma,  $C$  az aszimptotikus ráta,  $A$  a különbség a kezdeti és vég hibaráta között és  $B$  a tanulási ráta paraméter. A hibernáció utáni első alkalom eredményeit ANOVA-val elemeztük. A poszt-hoc tesztekben Tukey HSD tesztjét alkalmaztuk.

### **3.6. Western blotting, dot-blot immuneszt és enzimmel kötött immunszorbens módszer (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)**

Az állatokat szén-dioxid túlaltattuk, az agyvelőt azonnal eltávolítottuk. A célrégiót kivágtuk, lízis pufferben (20mM Tris puffer pH7,4, 100mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,5% NP40, 1mM DDT, 2µg/ml leupeptin, 100µg/ml PSMF, proteáz inhibitor mix (Roche)) ultrahanggal (szonikátor) homogenizáltuk. A mintákat 4°C-on 15 percig 14000xg sebességgel lecentrifugáltuk. A fehérje koncentráció meghatározást Bradford módszere alapján végeztük (Bradford, 1976). A mintákat azonos koncentrációra korrigáltuk (10 µg / 20 µl), 1x töménységű Laemmli pufferben 95 °C-on 5 percig forraltuk, majd nátrium dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) 8%-os poliakrilamid gélben szeparáltuk (150V, 1 óra). A fehérjéket polivinilidifluorid (PVDF) membránra transzferáltuk nedves közegben (100V, 1 óra). Az immundetektáláshoz a membránt 3%-os marhaszérumot (BSA) tartalmazó TBS oldatban (10mM TBS, 150nM NaCl) blokkoltuk 60 percig, majd az ugyanebben az oldatban feloldott primer antitestekkel inkubáltuk (3. táblázat) 4 °C-on éjszakán át. A membránt ezután 0,05% Tween 20-t tartalmazó TBS oldatban mostuk, majd a peroxidáz konjugált szekunder antitesteket (1:10000, JacksonImmunoResearch) ugyanebben az oldatban hígítva egy óráig hagytuk a membránon. A fehérjeszinteket denzitometria elv alapján (BIORAD XRS vagy Raytest Messgeräte) határoztuk meg. Normalizálásként ugyanazon membránon β-aktin immunreakciót és denzitometriát végeztünk.

Dot-blot analízisünkhöz a Bio-dot mikrofiltrációs készülékét (BIO-RAD) használtuk. A kiszáritott PVDF membránhoz mintánként 25 µg proteint kötöttünk, A BSA-val történő telítés után a membránt poliklonális anti-TRPV<sub>1</sub> antitesttel, majd peroxidáz konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk. A minták fehérje szintjét a már említett denzitometriás elv alapján határoztuk meg.

Az Aβ1-40 és Aβ1-42 fragmensek szintjét a Western blotting módszernél érzékenyebb ELISA módszerrel határoztuk meg, két kereskedelmi forgalomban beszerezhető ELISA-KIT-tel (Millipore), a mintakészítés és a fehérje meghatározás a gyártó javaslata alapján történt.

## 4. Eredmények

### 4.1. A dendritfa és az inter-neuronális kapcsolatok változásai amiloid prékurzor fehérje transzgenikus egérmodellekben

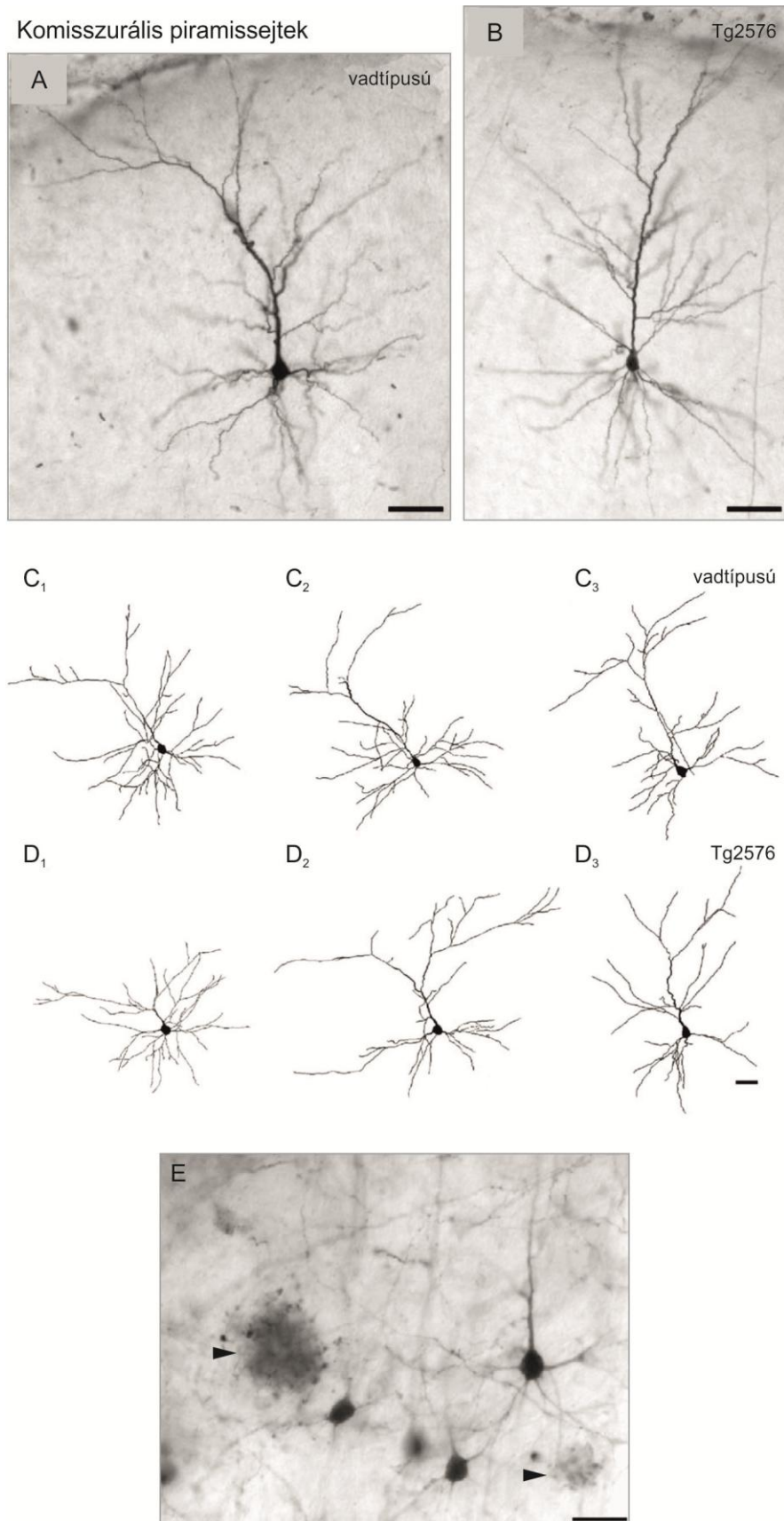
Több transzgenikus egérmodellben végeztünk neuroanatómiai vizsgálatokat. Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a humán vagy mutáns amiloid prékurzor fehérje expressziója, a különböző szolubilis A $\beta$  szintek és az esetleges/következményes amiloid lerakódás a kérgi struktúrát. Vizsgálataink célpontja a projekciós neuron (piramissejt) volt. A denrittűskékre is kiterjedő dendritometriás vizsgálatainkat ezen sejtek illetve a régió afferenseinek és efferenseinek mennyiségi analízisével egészítettük ki.

Morfometriai analíziseinket komisszurális II/III-as rétegű piramissejteken végeztük, a szomatoszenzoros kéregben. Ezzel a megszorítással egy morfológiailag homogén sejtpopulációt tudtunk vizsgálni (Duan és *mtsai*, 2002; Soloway és *mtsai*, 2002), melyek különösen érzékenyek és könnyen károsodnak Alzheimer kórban (Hof és *mtsai*, 1995).

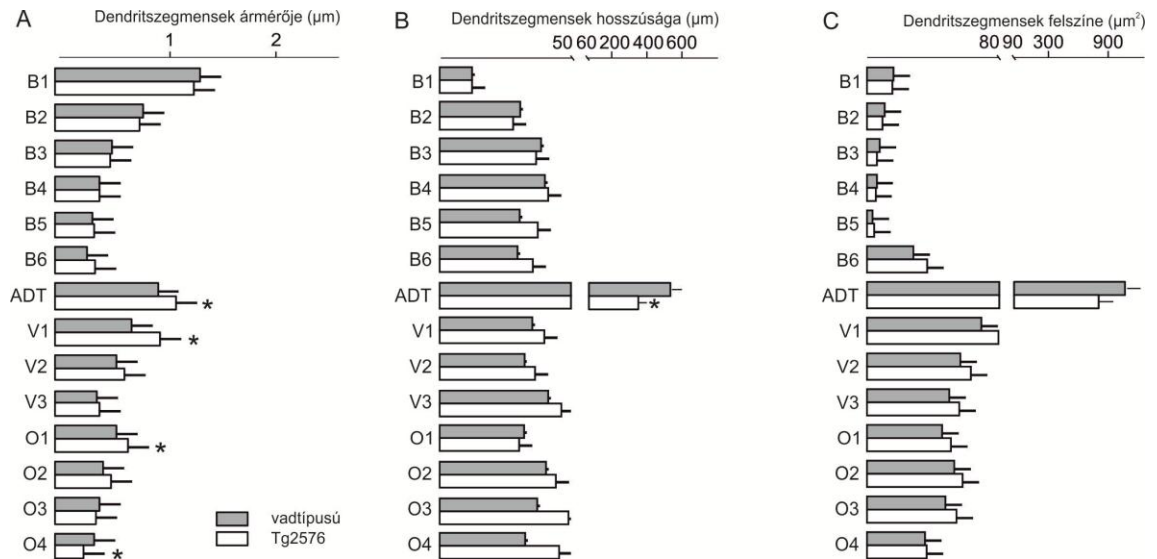
#### ***Emelkedett szolubilis A $\beta$ szint és az extracelluláris amiloid lerakódás hatásai***

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a lerakódott  $\beta$ -amiloid közvetlen környezetében dendrit degenerációt okoz (Knowles és *mtsai*, 1999; Le és *mtsai*, 2001; Tsai és *mtsai*, 2004). Kísérleteink ezzel szemben arra keresték a választ, hogy a magas  $\beta$ -amiloid szint és amiloidózis milyen globális változásokat okoz az agykéreg projekciós neuronjainak morfológiájában (6. ábra), függetlenül a hisztokémiailag detektálható szöveti károsodás aktuális helyétől, más szóval a fokális hatástól. A kísérletekben használt tízhónapos Tg2576 törzsű egerek agykérgében már masszív  $\beta$ -amiloid lerakódást találtunk (6E ábra).





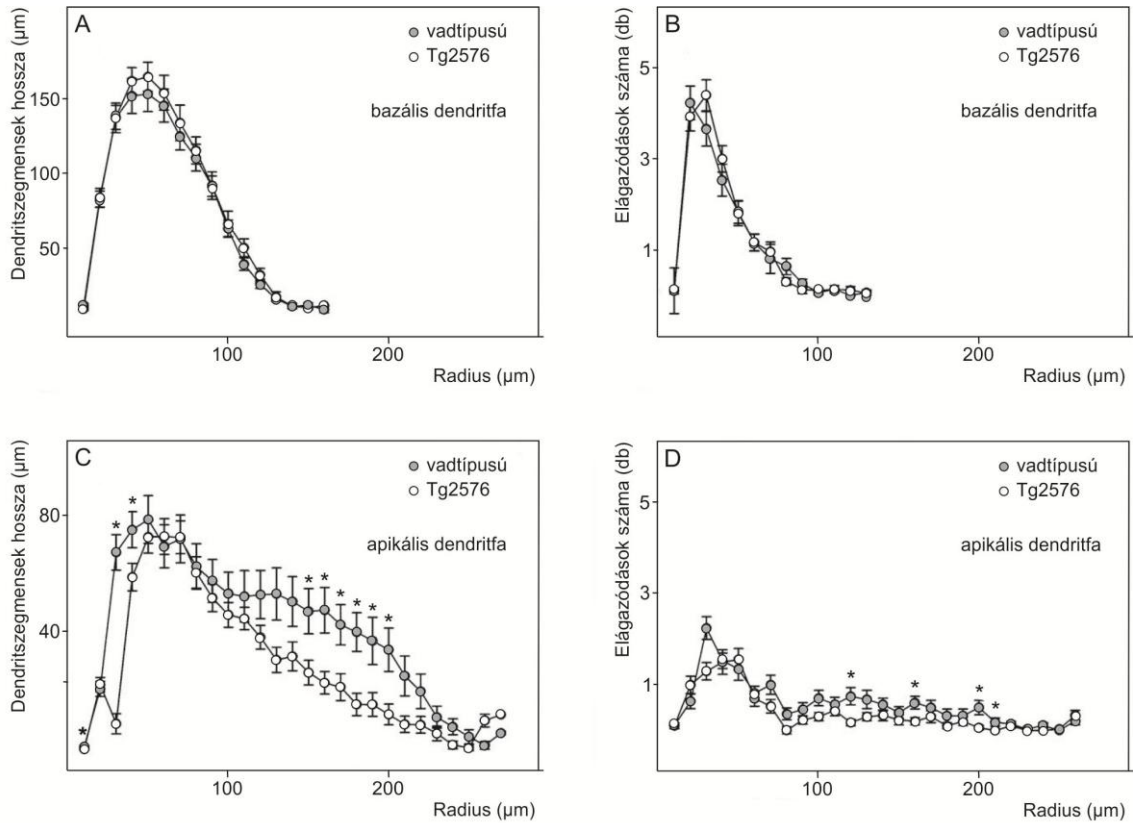
**6. ábra.** Retrográd feltöltött II/III. rétegi komisszurális piramissejtek fénymikroszkópos felvételei a primer szomatoszenzoros kéregből vadtípusú (A) és Tg2576 transzgenikus (B) egérben. Neurolucida programmal térben leképezett piramissejtek rajza vadtípusú (C<sub>1-3</sub>) és Tg2576 transzgenikus (D<sub>1-3</sub>) állatokban. Amiloid lerakódás Tg2576 transzgenikus egér agykérgében (E, nyílhegyek). Lépték 40  $\mu$ m (A, B), 20  $\mu$ m (C<sub>1</sub>-E).



**7. ábra.** Az apikális és bazális dendritfa szegmenseinek főbb mennyiségi jellemzői a Tg2576 transzgenikus egerek neokortikális piramissejtjeiben, a primer szomatoszenzoros kéregben. Az apikális dendritfa törzsének, valamint egyes vég- és oldalfácskák szegmenseinek átmérője a transzgenikus állatokban nagyobb lett (**A**), az apikális dendrittörzs hossza ugyanakkor csökkent (**B**). A dendritszegmensek felszíne változatlan maradt (**C**). A dendritszegmensek számának, térfogatának és alapi átmérőjének változásait a 4. táblázat tartalmazza. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (**A-C**).

#### *Az apikális dendritfa mérsékelt degenerációs változásokat mutat*

Az apikális dendrit arborizáció teljes hossza Tg2576 egerekben kisebb volt, mint a hasonló korú vadtípusú kontrollokban; annak összesített felszíne vagy térfogata ugyanakkor nem változott (4. táblázat). A részletes szegmensanalízis szerint a fő dendrittörzs mérőszámai hasonlóképpen alakultak, ami a megnövekedett átlagos dendritátmérő lévén jöhetett létre (4. táblázat, 7. ábra). A csúcsi szegmensek és az oldalfácskák hossza, felszíne és térfogata változatlan maradt, a szegmenseken belül mérsékelt átrendeződést figyeltünk meg (4. táblázat, 7. ábra). Így az első és második csúcsi szegmensek alapátmérője és az első szegmensek átlagos átmérője a Tg2576 állatokban megnövekedett, ami együtt járt a negyedik és ötödik csúcsi szegmensek átlagos átmérőjének csökkenésével (4. táblázat). Ezzel párhuzamosan az oldalfácskák száma csökkent (vadtípusú:  $4,78 \pm 0,33$  vs. Tg2576:  $3,27 \pm 0,28$ ; \* $p < 0,05$ ), és legfeljebb ötödik szegmenseket detektálhattunk (4. táblázat). Az elágazási pontok (vadtípusú:  $14,87 \pm 1,26$  vs. Tg2576:  $10,00 \pm 0,71$ ; \* $p < 0,05$ ) valamint a dendritvégek (vadtípusú:  $15,87 \pm 1,26$  vs. Tg2576:  $11,06 \pm 0,69$ ; \* $p < 0,05$ ) számainak csökkenése is a dendritfa zsugorodását mutatta. Sholl analízissel kimutattuk, hogy különösen az arborizáció középső része – a sejtesttől 140-200  $\mu\text{m}$  távolságban – szenvedett változásokat (8. ábra).



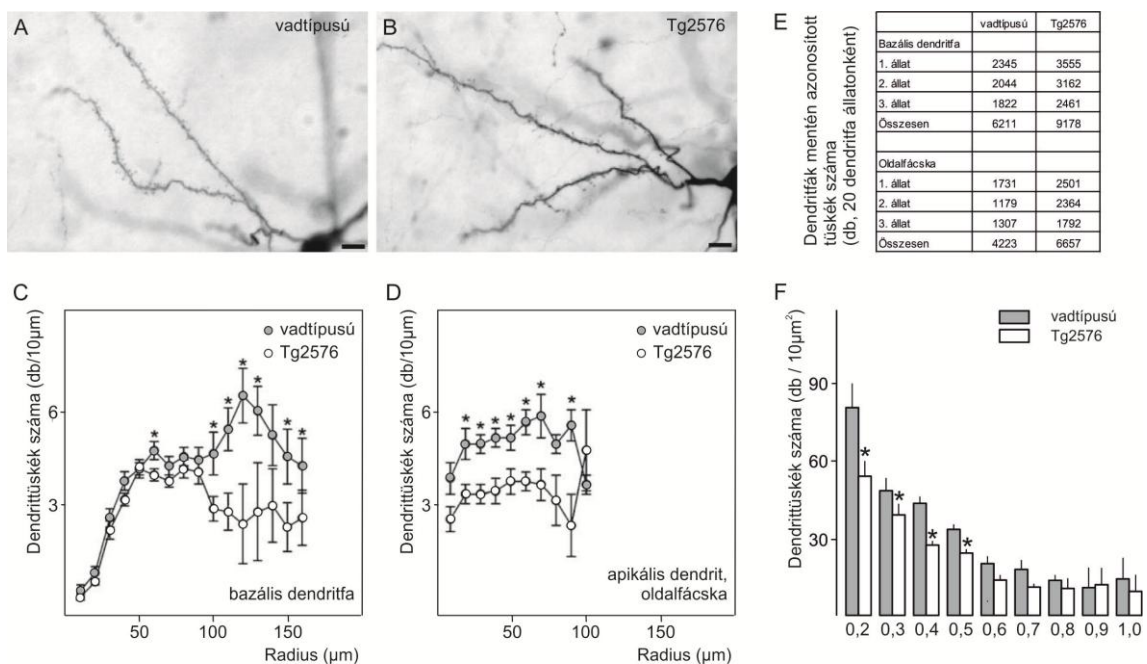
**8. ábra.** Tg2576 transzgenikus egerek primer szomatoszenzoros kérgi piramissejt dendritfáinak Sholl analízise. A sejtesttől mért távolság függvényében a dendritszakaszok összesített hossza és az elágazódások száma a bazális dendritfában nem különbözött (**A**, **B**), míg az apikális dendritfa középső és distális részében megnövekedett (**C**, **D**). Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (**A-D**).

#### *A bazális dendritekben nem találtunk morfometriai változást*

Szemben az apikális dendritekkel, a bazális arborizáció gyakorlatilag semmilyen változást nem mutatott Tg2576 egerek piramissejtjeiben. A dendritfa összesített hossza, felszíne vagy térfogata változatlan maradt, és a szegmensekben sem találtunk hasonló jellegű változásokat (4. táblázat). Egyedül a negyedik és hatodik szegmensek alapátmérője növekedett meg transzgenikus állatokban a vad típusúakban találtakhoz képest, de ez a szegmensek további – átlagos átmérő, felszín vagy térfogat – mutatóiban, mérőszámaiban nem okozott változást (4. táblázat, 7. ábra). Az elágazási pontok száma nem változott (vad típusú:  $15,47 \pm 0,97$  vs. Tg2576:  $16,16 \pm 0,94$ ;  $p > 0,05$ ), hasonlóan a dendritvégek számához (vad típusú:  $19,6 \pm 1,14$  vs. Tg2576:  $20,4 \pm 1,12$ ;  $p > 0,05$ ). Ezzel összhangban a dendrit szakaszok száma (denzitása) és az elágazódási pontok gyakorisága a sejtesttől való távolság függvényében sem változott (8. ábra).

*A Tg2576 transzgenikus állatok piramissejtjeinek mind az apikális, mind a bazális dendritszegmensein csökken a dendrittüskék sűrűsége*

A dendrittüskék sűrűségét a sejttesttől való távolság függvényében határoztuk meg, mint azok egységnyi dendrithosszra eső számát (9. ábra). Ezen Sholl analízis szerint a dendrittüskék sűrűsége a bazális dendritfa középső- és disztális területén a transzgenikus állatokban a vad típusúakhoz hasonlítva jelentősen csökkent (9C ábra), míg a sejttesthez közel változatlan maradt. Az apikális dendritfa oldalfácskáin az egységnyi dendrithosszra eső dendrittüskék száma még kifejezettebben csökkent, függetlenül a dendritörzstől mért távolságtól (9D ábra).



**9. ábra.** A dendrittüskék sűrűségének változása Tg2576 egerek piramissejtjeinek bazális dendritjein (A,B). Transzgenikus állatokban a dendrittüskék sűrűsége mind a bazális dendritek disztális részén (C), mind az apikális dendritek oldalfácskáinak egészén (D) csökkent. A nagyszámú dendrittüskék analízise (E) azt mutatta, hogy a változás független a dendritszegmens átmérőjétől (F). Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (C,D,F). Lépték 10  $\mu\text{m}$  (A, B).

A dendrittüskék száma és detektálhatósága függ az adott dendritszakasz vastagságától (Larkman, 1991c), mely hibalehetőséget rejt a mennyiségi analízisben. Ezt kiküszöbölendő a dendritszakaszokat átmérőjük szerint csoportosítottuk, és az azon megállapított dendrittüske sűrűséget összehasonlítottuk a transzgenikus és vad típusú állatokban. Ezt a vizsgálatot csak az oldalfácskák esetében végeztük el, lévén a bazális dendritfák szegmensei átmérőjükben nem mutattak különbséget (4. táblázat, 7A ábra). Megállapítottuk, hogy az azonos átmérőjű dendritszegmenseken is jelentősen csökkent a dendrittüskék sűrűsége a transzgenikus állatokban a

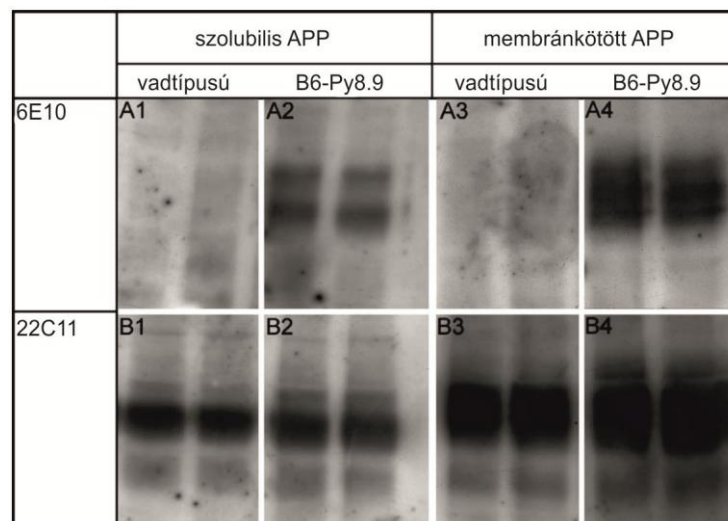
vadtípusúakhoz képest (7F ábra), mely egyúttal az abszolút dendrittűszám csökkenésére is utal.

### ***Amiloid lerakódáshoz nem vezető prékurzor protein expresszió hatásai***

Az ezen kísérletekben alkalmazott B6-Py8.9 egérmodell a vadtípusú (nem mutáns) humán amiloid prékurzor proteint expresszálja az endogén egér amiloid prékurzor protein mellett, azzal azonos szinten, amely nem vezet az agyszövetben amiloid lerakódáshoz. Az agyvelőben a transzgén elsősorban kortikális és hippokampális piramissejtek expresszálják (Lamb és *mtsai*, 1993).

### ***Humán amiloid prékurzor protein detektálása a B6-Py8.9 egértörzsben***

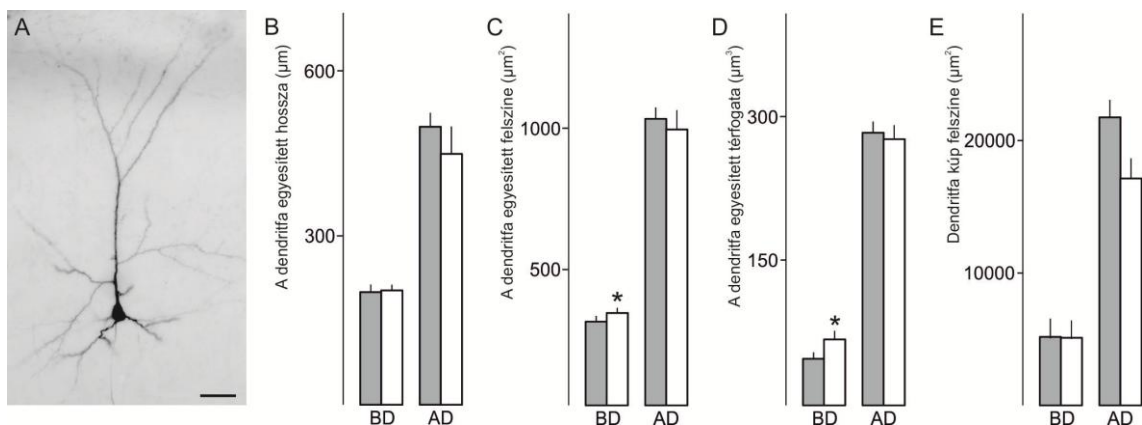
Western blot analízissel bizonyítottuk, hogy a transzgenikus egértörzsben az endogén amiloid prékurzor protein mellett a humán fehérje is expresszálódik. Utóbbi a 6E10 antitest használatával több detektációs helyen (csíkkal) jelentkezett, mely a fehérje poszttranszlációs modifikációjára utalhat. Mind a humán, mind az endogén fehérjét kimutattuk a membránkötött és a szolubilis frakcióban is (10. ábra). A teljes amiloid prékurzor fehérje mennyisége a transzgenikus állatban csekély emelkedést mutatott.



**10. ábra.** Szolubilis (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) és membránkötött (A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>) amiloid prékurzor fehérje Western blot analízise. A 6E10 jelű antitesttel azonosított humán amiloid prékurzor protein csak a B6-Py8.9 transzgenikus állatokban van jelen (A<sub>2</sub>, A<sub>4</sub>). A 22C11 antitest mind a humán, mind az endogén fehérjét felismeri.

*A humán amiloid prékurzor fehérje expressziója a bazális dendritfa felszínének növekedéséhez vezet*

Megállapítottuk, hogy a bazális dendritfák összesített felszíne és volumene a transzgenikus állatok szomatoszenzoros kérgi piramisisejtjeiben növekszik, míg hossza változatlan marad (5. táblázat, 11. ábra). Ezzel összhangban az intermedier - második, harmadik és negyedik - dendrit szegmensek átlagos átmérője növekedett, ugyanakkor utóbbi kettő hossza csökkent a transzgenikus csoportban (5. táblázat). Ugyanezen szegmenseken több elágazódási pontot is azonosítottunk, ugyanakkor az ötödik és többedik dendritszakaszok száma szignifikánsan nem emelkedett (5. táblázat). Csak a transzgenikus mintákon tudtunk azonosítani nyolcadik dendrit szegmenst. Sholl analízissel kimutattuk, hogy a dendritek végeinek száma a sejttesttől 90  $\mu\text{m}$ -re vagy attól távolabb a transzgenikus állatok piramisisejtjein kismértékben csökkent, ami a dendritfa visszahúzódására utal (12A,C ábra).



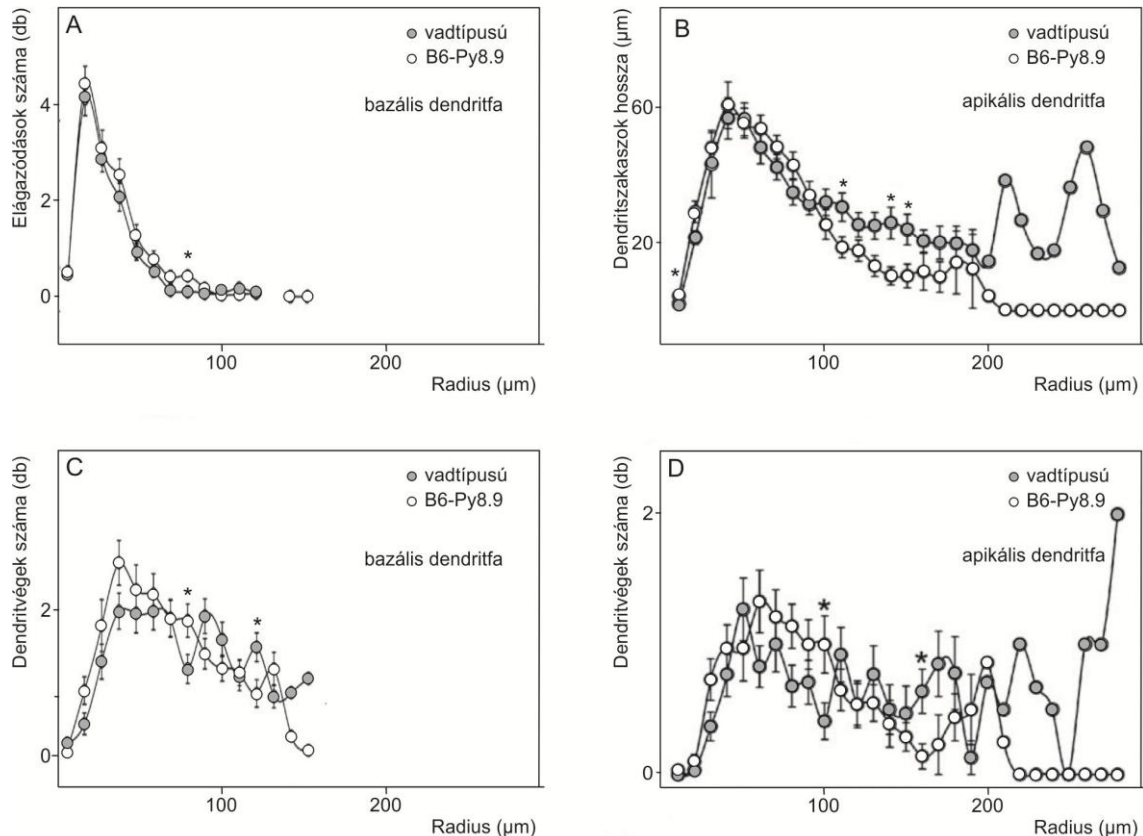
**11. ábra.** Retrográd feltöltött II/III. rétegi komisszurális piramisisejt fénymikroszkópos képe B6-Py8.9 transzgenikus egér primer szomatoszenzoros kérgében (A). A bazális és apikális dendritfák hossza (B), felszíne (C), térfogata (D) és a dendritfákat lefedő kúp térfogata (E) vad típusú és transzgenikus állatokban. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (B-E). Lépték: 25  $\mu\text{m}$  (A).

*Hasonló, de kisebb mértékű változások az apikális dendritfán*

Az apikális dendritfák összesített hossza, felszíne, térfogata a transzgenikus és vad típusú állatok kérgi piramisisejtjeiben gyakorlatilag megegyezett (11B-D ábra). Az elágazódási pontok számában sem találtunk változást (vad típusú  $8,8 \pm 0,72$  vs. B6-Py8.9:  $9,67 \pm 0,67$ ;  $p > 0,05$ ). Ennek megfelelően – és a bazális dendritfához hasonlóan – az apikális dendritfa globális kiterjedése is változatlan maradt, amit a dendritfát lefedő kúp felszínének mérőszámával jellemeztünk (convex hull analysis, 11E ábra).



Fenti negatív eredmények mellett Sholl analízissel végzett kiegészítő vizsgálataink ugyanakkor átrendeződésre világítottak rá a dendritfán belül. Transzgenikus egerek piramisisejtjein a dendritikus denzitás (12B, D ábra) csökkent a dendritfa disztális területén. Ezzel összhangban a dendritvégek sejttesttől mért távolsága transzgenikus egerek piramisisejtjein az apikális arborizáción belül csökkent a vad típusúakhoz képest (vad típusú  $105,97 \pm 3,3$  vs. B6-Py8.9:  $92,92 \pm 2,64$ ;  $*p < 0,05$ ).



**12. ábra.** B6-Py8.9 transzgenikus egerek primer szomatoszenzoros kérgi piramisisejt dendritfáinak Sholl analízise. A sejttesttől mért távolság függvényében a dendritelágazódások (A) és dendritvégek (C) száma a bazális dendritfában nem különbözött, csak a disztális régióban találtunk mérsékelt csökkenést a dendritvégek számában a B6-Py8.9 egértörzsben. Az apikális dendritfa középső szakaszán a dendritszakaszok összesített hossza egyes rádiusszegmensekben csökkent (B), a dendritvégek száma a sejttesttől mért távolságtól függetlenül változatlan maradt (D). Átlag  $\pm$  standard hiba,  $*p < 0,05$  (A-D).

### **Az amiloid prékurzor fehérje expressziója és az afferentáció változásai**

Dendritfákon végzett morfometriai vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy az amiloid prékurzor protein vad típusú formájának amiloid lerakódáshoz nem vezető expressziója a dendritnövekedést segíti, ezzel szemben az amiloid lerakódást okozó mutáns protein expressziója – a dendrittűskék pusztulását, de nem a dendritfák általános felépítését tekintve - degeneratív hatású. Következő lépésünkben azt vizsgáltuk meg, hogyan

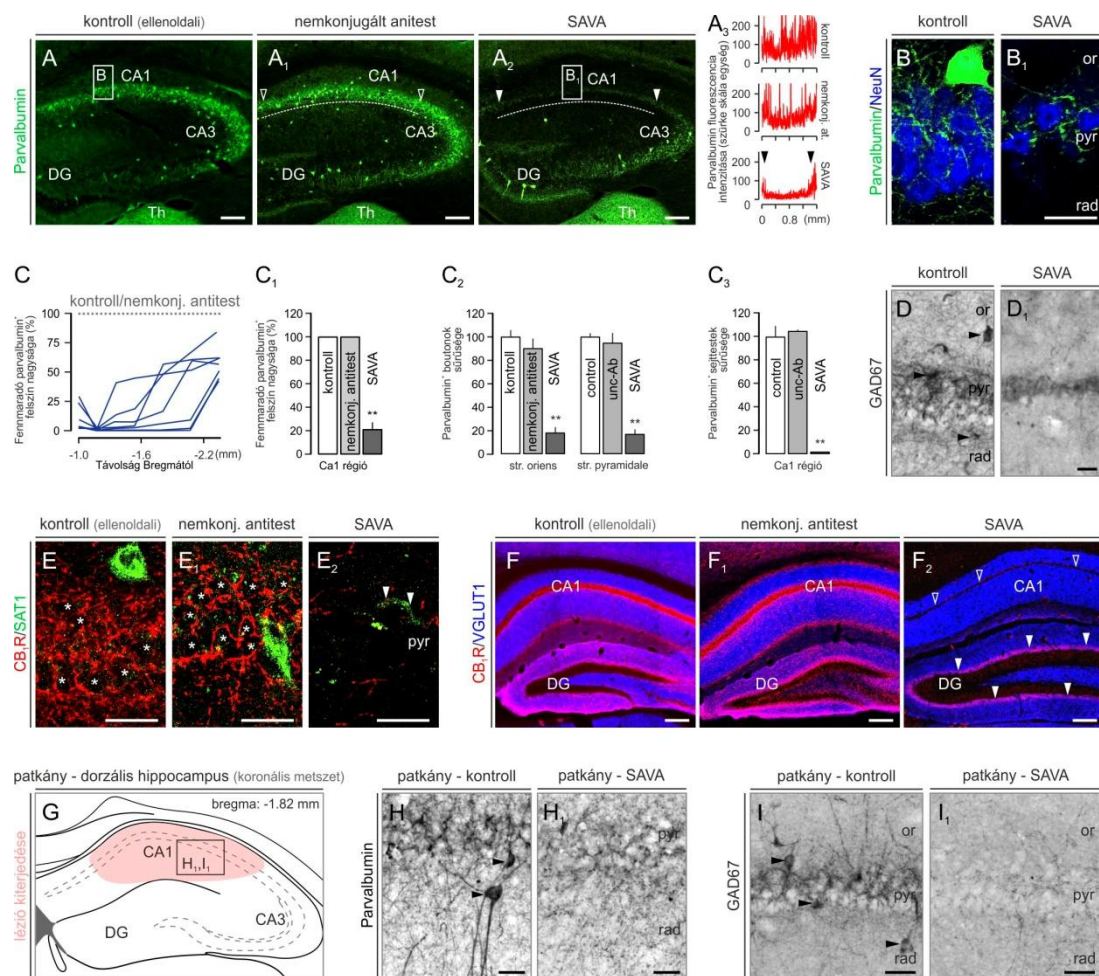
alakul a megváltozott dendrit morfológiájú piramissejtek afferentációja a B6-Py8.9 és Tg2576 egértörzsekben.

*Kitekintés: a gátló interneuronok neuronhálózatban betöltött jelentősége, azok szelektív kiiktatásának lehetősége*

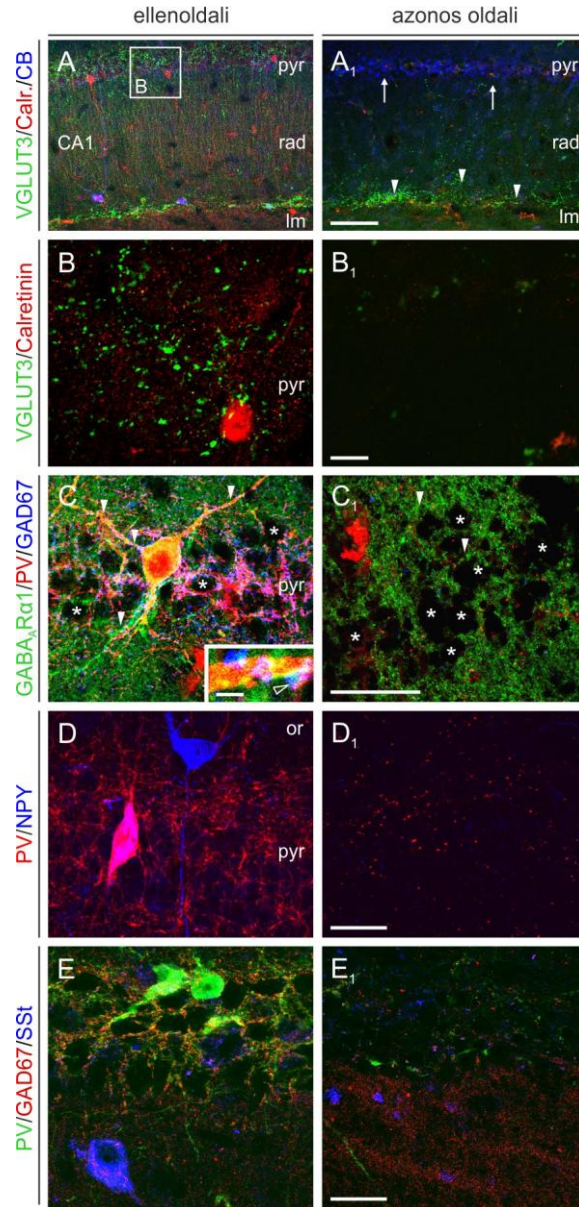
Az afferensek közül külön figyelmet szenteltünk a gátló, GABAerg idegsejtek végződéseinek, melyeket vezikuláris GABA transzporter (VGAT) ellenes immunhisztokémiával mutattuk ki. *In vivo* kísérletekkel bizonyítottuk, hogy saporin-konjugált vezikuláris GABA transzporter ellenes antitest alkalmazásával a gátló interneuronok szelektíven elpusztíthatóak, és ez a hippocampális neuronhálózat morfológiai átépüléséhez és funkcionális hanyatlásához vezet. Tizenkét nappal a dorzális hippocampusba adott injekció után az egerek érintett régiójának parvalbumin-immunoreaktivitása rendkívüli mértékben csökken, míg nemkonjugált vezikuláris GABA transzporter ellenes antitest adása után nem találtunk változást (13A-B<sub>2</sub> ábra). Az injekció helyétől 600 µm-es távolságban tapasztaltunk hatást (13C ábra), mely mind a parvalbumin-immunreaktivitást megőrző terület nagyságában (13C<sub>1</sub> ábra), mind a parvalbumin-immunopozitív<sup>(+)</sup> butonok (13C<sub>2</sub> ábra) és sejttestek (13C<sub>3</sub> ábra) számának csökkenésében megnyilvánult. Az interneuronok pusztulását további markerek csökkenésével is megerősítettük. A GAD67 (13D-D<sub>1</sub> ábra), a parvalbumin<sup>+</sup> kosársejtek alternatív markerének számító SAT1 és a kolecisztokinin-tartalmú interneuronokat jelölő CB<sub>1</sub> receptor expressziója (13E-F<sub>1</sub> ábra) rendkívüli mértékben csökkent, míg a VGLUT1<sup>+</sup> serkentő szinapszisokban előforduló CB<sub>1</sub> receptor expressziója változatlan maradt (13F<sub>2</sub> ábra). Kíséreltünket patkányban is elvégeztük, és azonos eredményre jutottunk (13G-I<sub>1</sub> ábra).

A saporin-konjugált vezikuláris GABA transzporter ellenes antitest nemcsak a parvalbumin<sup>+</sup> interneuronokat pusztította el, hanem a gátló interneuronok széles köre hasonló érintettséget mutatott. Konfokális lézer szkennig mikroszkóppal végzett vizsgálataink rámutattak, hogy a calretinin<sup>+</sup>, calbindin<sup>+</sup>, VGLUT3<sup>+</sup>, neuropeptid Y<sup>+</sup> és szomatosztatin<sup>+</sup> gátló interneuronokat a saporin-konjugált vezikuláris GABA transzporter ellenes antitest ugyanúgy elpusztítja (14A-E<sub>1</sub> ábra). A hatás specificitását mutatja, hogy a stratum radiatum és lacunosum moleculare határán található VGLUT3<sup>+</sup> szerotoninerg rostok, a calbindin<sup>+</sup> piramissejtek és a posztzinaptikus oldalon található GABA<sub>A</sub> receptor α1 alegységek (Fritschy és *mtsai*, 1992) nem károsodtak a kezelés után (14A, A<sub>1</sub>, C, C<sub>1</sub> ábra).





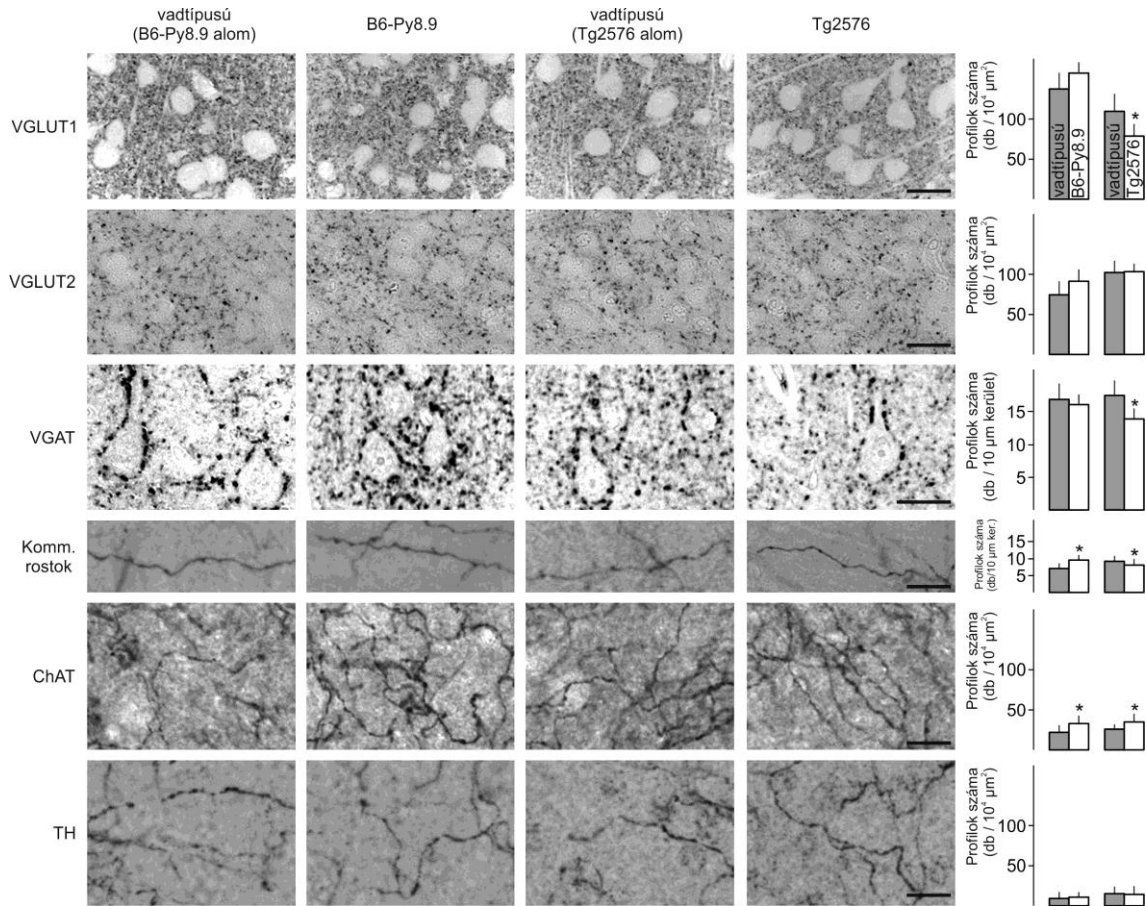
**13. ábra.** Parvalbumin<sup>+</sup> interneuronok kontroll (A), nemkonjugált antitesttel (A<sub>1</sub>) és saporin-konjugált antitesttel (A<sub>2</sub>) kezelt állatok hipocampusában 12 nappal a beavatkozás után. A parvalbumin-immunofluoreszcencia változása a CA1-3 régiókban a kezelések után markánsan különbözött (A<sub>3</sub>, a nyílhegyek a lézió határait jelölik). A parvalbumin<sup>+</sup> butonok számának csökkenése a NeuN<sup>+</sup> CA1 piramissejtek számának csökkenésével is járt (B, B<sub>1</sub>). Parvalbumin<sup>+</sup> elemek változása a CA1 régióban a kezelés után (C-C<sub>3</sub>). A saporin-konjugált antitest kezelés a GAD67<sup>+</sup>, CB1 receptor<sup>+</sup>, SAT1<sup>+</sup> elemek számának radikális csökkenését váltotta ki (D-E<sub>2</sub>), míg a VGLUT1-immunoreaktivitás változatlan maradt (F-F<sub>2</sub>). A patkányban alkalmazott léziók (G) az egérhez hasonlóan a parvalbumin<sup>+</sup> (H, H<sub>1</sub>) és GAD67<sup>+</sup> (I, I<sub>1</sub>) elemek számának csökkenéséhez vezettek. **Rövidítések:** CA1-CA3 cornu ammonis régiók, DG gyrus dentatus, Th talamusz, or stratum oriens, pyr stratum pyramidale, rad stratum radiatum. **Lépték:** 500 µm (A-A<sub>2</sub>, F-F<sub>2</sub>), 25 µm (B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, H-I<sub>1</sub>), 15 µm (E-E<sub>2</sub>).



**14. ábra.** A saporin-konjugált antitest radikálisan csökkentette a calbindin<sup>+</sup>, calretinin<sup>+</sup> és VGLUT3<sup>+</sup> interneuronok számát (A-B<sub>1</sub>), míg a VGLUT3<sup>+</sup> szerotoninergerg végződések (A<sub>1</sub>, *nyílhegyek*) sértetlenek maradtak. A GAD67<sup>+</sup> és parvalbumin<sup>+</sup> elemek számának csökkenése a GABA<sub>A</sub> receptor α1 alegység immunoreaktivitásának változatlanságával járt együtt (C, C<sub>1</sub>). Az NPY<sup>+</sup> és szomatosztatin<sup>+</sup> butonok és sejtestek száma a beavatkozás után nagymértékben csökkent (D-E<sub>1</sub>). *Rövidítések:* **lm** stratum lacunosum moleculare, **or** stratum oriens, **pyr** stratum pyramidale, **NPY** neuropeptid Y, **PV** parvalbumin, **rad** stratum radiatum, **SSt** szomatosztatin. *Lépték:* 200 μm (A<sub>1</sub>), 25 μm (B<sub>1</sub>-E<sub>1</sub>).

*A serkentő és gátló afferensek mennyiségi változásai B6-Py8.9 és Tg2576 egerekben*

A VGAT<sup>+</sup> profilokat nagy sűrűségben elsősorban piramis sejtek szómája körül találtuk. Ezek sűrűsége az V. rétegi piramis sejtek teste körül a Tg2576 állatokban csökkent, míg a B6-Py8.9 egerekben változatlan maradt (6. táblázat, 15. ábra).



**15.ábra.** VGLUT1-, VGLUT2-, VGAT-, ChAT- és TH-immunoreaktivitás, valamint anterográdfeltöltött piramissejt axonszakaszok B6-Py8.9 és Tg2576 transzgenikus egerekben és azonos alomból származó kontrolljaikban. Tg2576 állatok primer szomatoszenzoros kérgének II/III. rétegében a VGLUT1<sup>+</sup> profilok, valamint a piramissejtek szómája körül a VGAT<sup>+</sup> profilok sűrűsége csökkent, míg a B6-Py8.9 egerekben változatlan maradt. A VGLUT2<sup>+</sup> és TH<sup>+</sup> profilok sűrűségében egyik egértörzsben sem találtunk változást, míg a ChAT<sup>+</sup> végződés sűrűsége mindkét egértörzsben növekedett. Az anterográdfeltöltött axonok mentén az egységnyi hosszra eső varikozitások száma a B6-Py8.9 egerekben növekedett, míg a Tg2576 egerekben csökkent. *Lépték:* 20 μm.

A specifikus afferensek közül a VGLUT2<sup>+</sup> talamokortikális afferensek sűrűségében nem találtunk változást azok fő végződési területén, a szomatoszenzoros kéreg IV. rétegében egyik transzgenikus egértörzsben sem (6. táblázat, 15. ábra). Ezzel szemben a Tg2576 egértörzsben az intra- és interhemiszfikus afferenseket jelölő VGLUT1<sup>+</sup> profilok sűrűsége csökkent a supragranuláris (II. és III.) rétegekben, ahol a principális sejtek dendritanalízisét is végeztük (6. táblázat, 15. ábra). Ellentétes előjelű, de statisztikailag nem jelentős emelkedést figyeltünk meg ugyanakkor a B6-Py8.9 transzgenikus állatokban (6. táblázat, 15. ábra) a kontroll állatokhoz képest.

A VGLUT1<sup>+</sup> preszinaptikus profilok sűrűségének változásával összecsengően változott az axonok mentén azonosítható varikozitások, *en-passant* boutonok sűrűsége is. Míg a vad típusú humán prékurzor proteint expresszáló B6-Py8.9 egerekben a

komisszurális axonokon a varikozitások kisebb, addig a mutáns fehérjét expresszáló, amiloid lerakódást mutató Tg2576 állatokban mind a komisszurális, mind a kortikostriatalis axonokon nagyobb távolsággal követték egymást (6. táblázat, 15. ábra), mint a kontroll állatokban.

A specifikus afferensek mellett a szinapszisok képzésben permisszív szerepet játszó (Gu, 2002) ChAT<sup>+</sup> kolinerg és TH<sup>+</sup> monoaminerg nemspecifikus afferenseket is mennyiségi analízisnek vetettük alá. Míg utóbbi terminálisok denzitásában nem találtunk változást egyik egértözsben sem, a kolinerg butonok sűrűsége jelentősen megemelkedett mind a B6-Py8.9, mind a Tg2576 állatokban a kontrollokban mértékhez képest (6. táblázat, 15. ábra).

### ***Az afferens depriváció morfogenetikai hatásai***

Ezekhez a kísérletekhez a bajuszszőrök eltávolításának modelljét (vibrisssectomia) választottuk. Előző dendrit analíziseinkben megmutattuk, hogy a vad típusú, humán amiloid prékurzor protein expressziója trofikus, míg mutáns változatának expressziója a dendritfa általános felépítését, felszínének változását tekintve csak mérsékelten degeneratív hatású. Ebben a lépésben kimutattuk, hogy az afferens depriváció okozta dendrit degenerációt a vad típusú humán amiloid prékurzor protein expressziója csökkenti, míg az amiloid lerakódást okozó mutáns változata súlyosbítja azt (16. ábra).

### ***A vad típusú amiloid prékurzor fehérje expresszió hatásai***

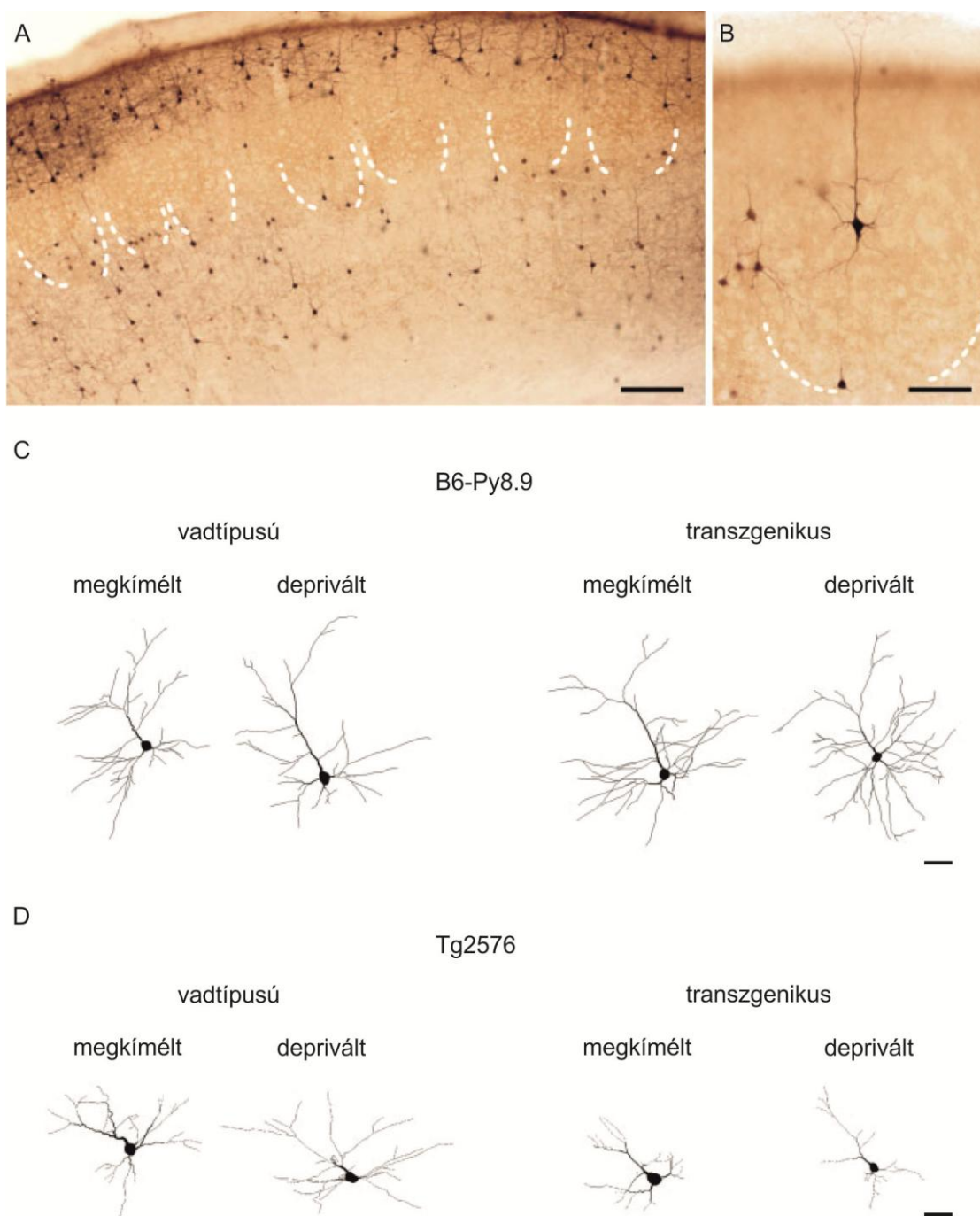
Mind a B6-Py8.9 transzgenikus, mind a kontroll állatokban (16C ábra) jelentős átmérőcsökkenést mértünk a dendritfák proximális és disztális részein egyaránt (17A,D ábra) bajuszszőrirtás után. A dendrit szegmensek rövidülése nem volt jellemző, azt csupán néhány szegmens esetén figyelhettük meg (17B,E ábra). Előbbivel összhangban a dendrit szegmensek felszíne csökkent (17C,F ábra). Lényeges különbségeket találtunk ugyanakkor a két genotípus között, mert a zsugorodás mértéke, különösen az apikális arborizációban, a transzgenikus állatokban kisebb volt, vagy egyáltalán nem jelentkezett (17C,F ábra).

A bazális dendritek legtöbb szegmensének átmérője mind a transzgenikus, mind a kontroll állatokban jelentősen csökkent (17A,D ábra) bajuszszőr eltávolítás után, ami együtt járt a szegmensek felszínének csökkenésével (17C,F ábra). Vad típusú állatokban a dendritfa felszínének csökkenését tovább fokozta, hogy annak összesített hossza csökkent (17B,E ábra); hasonló megfigyelést a transzgenikus csoportban nem figyeltünk meg.

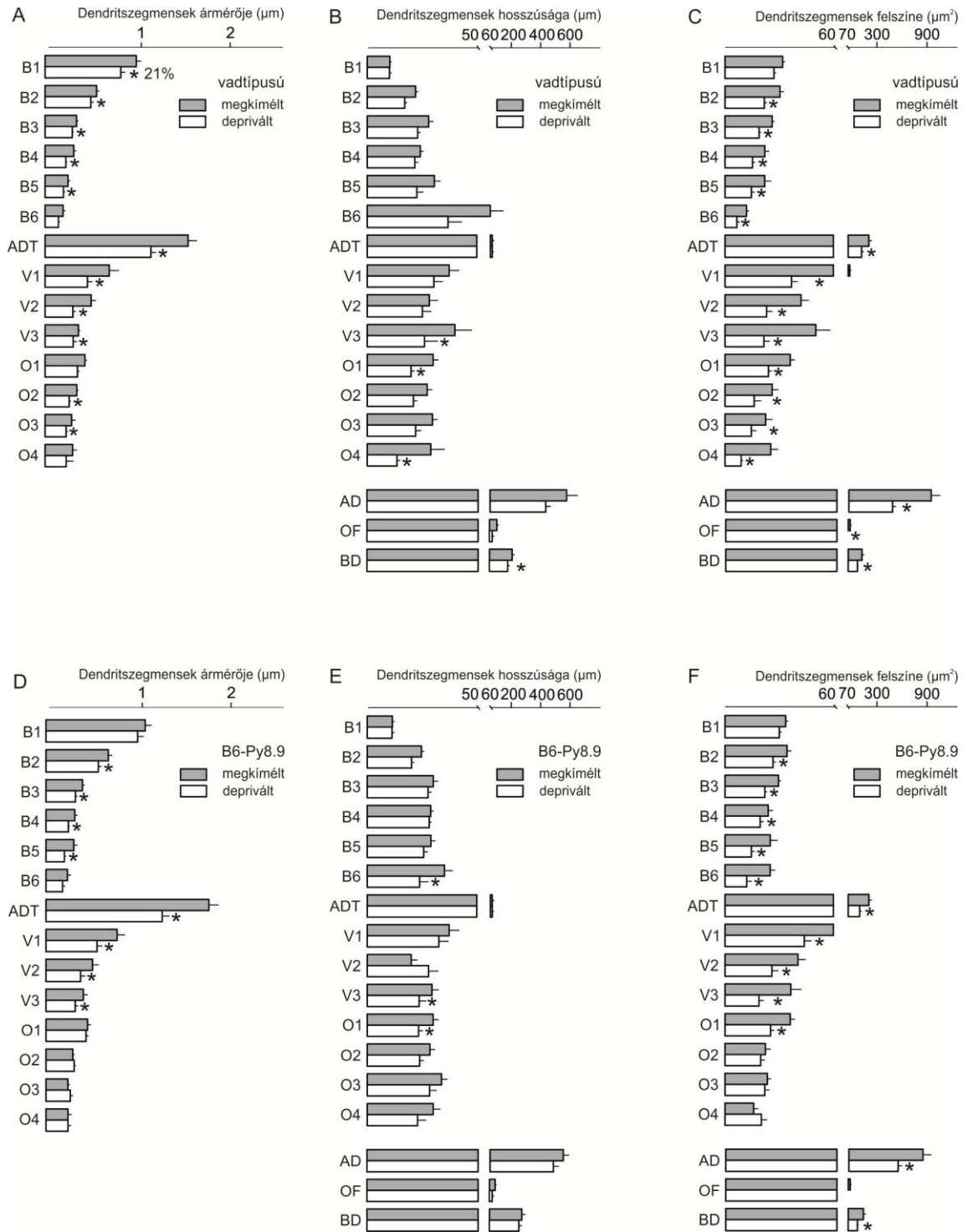
Az apikális dendritfákban a dendrittörzs és a csúcsi dendrit szegmensek átmérői mind a transzgenikus, mind a vad típusú csoportban csökkentek bajuszszőrök



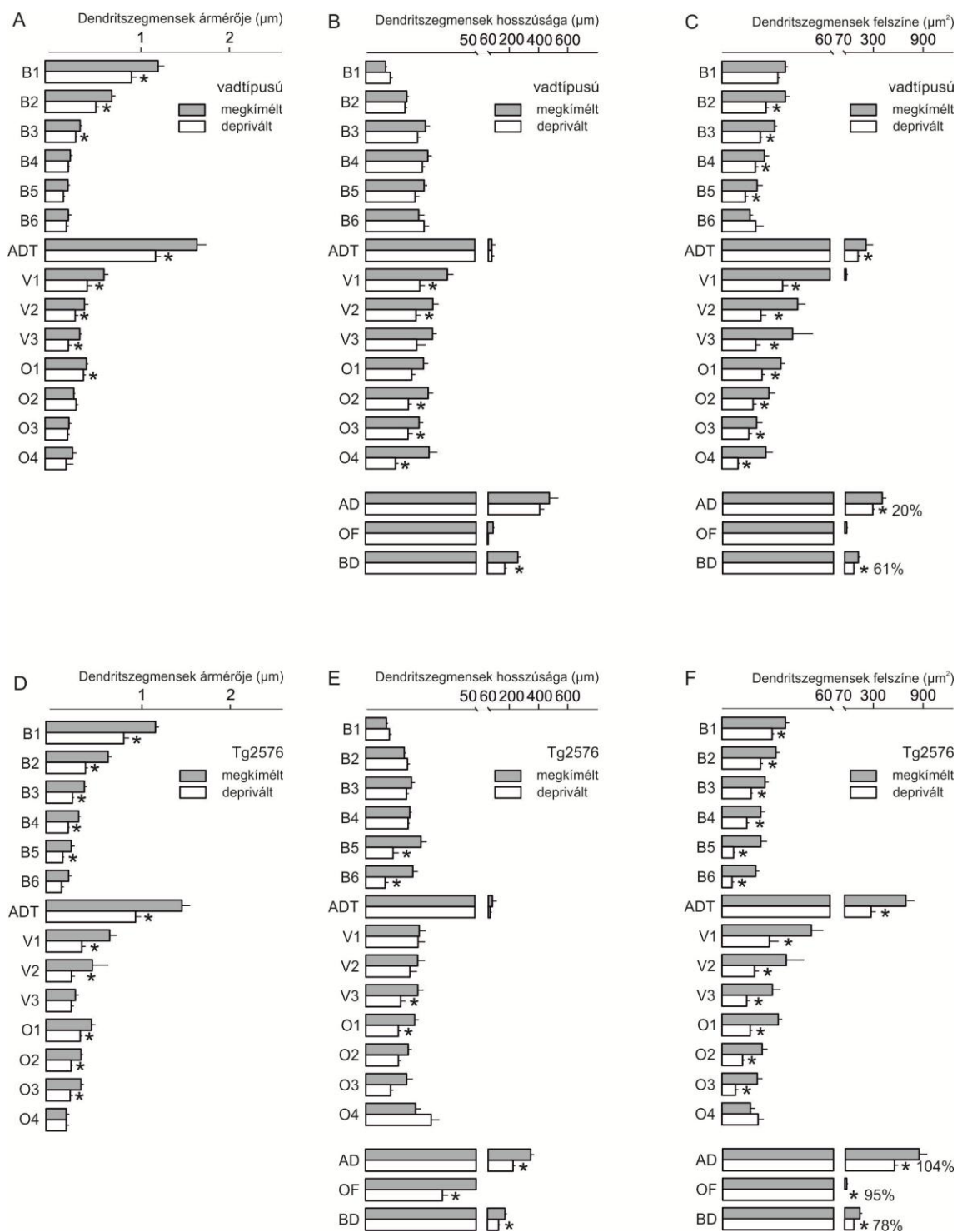
eltávolítása után, ami a dendritikus felszín csökkenését vonta maga után (17A,C,D,F ábra). Kísérletes beavatkozásunk a transzgenikus csoportban ugyanakkor nem befolyásolta az oldalfácskák szegmenseinek átmérőjét és felszínét, szemben a vad típusú csoporttal, ahol ezen paraméterek jelentősen csökkentek (17A,C,D,F ábra).



**16. ábra.** Retrográd feltöltött piramis sejtek fénymikroszkópos képe a barrel cortexben (A,B). A fehér szaggatott vonalak a VGLUT2-immunreakcióval láthatóvá tett barleket emelik ki. Neurolucida programmal térben leképezett piramis sejtek rajza B6-Py8.9 vad típusú (C) és Tg2576 transzgenikus (D) állatokban, azonos alombeli kontrollokkal. Az ábrákon egyoldali bajuszszőrítés után a megkímélt és deprivált oldalon is leképeztünk neuronokat. *Lépték* 150  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B,C,D).



**17. ábra.** Az apikális és bazális dendritfa szegmenseinek mennyiségi jellemzői bajuszszőrtás után a B6-Py8.9 transzgenikus egerek komisszurális piramissejtjeiben, a primer szomatoszenzoros kéregben. Az azonos alomból származó vad típusú állatokhoz képest az apikális dendritfa oldalfácskáinak bajuszszőrtás okozta átmérő- (A,D) és felszínszökkenése (C,F) a transzgenikus állatokban elmaradt, és a bazális dendritfa összesített hossza is csak vad típusú állatokban csökkent (B,E). Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-F).



**18. ábra.** Az apikális és bazális dendritfa szegmenseinek mennyiségi jellemzői bajuszszőrtás után a Tg2576 transzgenikus egerek komisszurális piramissejtjeiben, a primer szomatoszenzoros kéregben. Az azonos alomból származó vad típusú állatokhoz képest mind a bazális, mind az apikális dendritfa csaknem valamennyi szegmensében jelentős átmérő- (**A,D**) és felszín-szökkenést (**C,F**) találtunk. Az apikális dendritfa hossza csak a transzgenikus állatokban csökkent. A dendritfák felszínének zsugorodása a Tg2576 egerekben kifejezettebb volt (**C,F**). Átlag ± standard hiba, \**p* < 0,05 (**A-F**).

*A mutáns amiloid prékurzor fehérje expresszió hatásai*

A bazális dendritfákban az alkalmazott afferens depriváció a vadttípusú csoportban a proximális szegmensei átmérőjének csökkenéséhez vezetett (18A ábra), míg azok hossza változatlan maradt (18B ábra). A Tg2576 transzgenikus populációban ez a csökkenés nagyobb mértékű volt, továbbá az átmérő csökkenés a disztális szegmensekre is kiterjedt (18D,E ábra). A következményes dendrit felszín csökkenést a transzgenikus csoportban tovább fokozta a disztális dendrit szakaszok rövidülése (18C,F ábra).

Az apikális dendritfákon a dendrittörzs, a csúcsi szegmensek és az oldalfácskák szegmenseinek átmérői is jelentősebben csökkentek bajuszszőr eltávolítás után a transzgenikus, mint a vadttípusú csoportban (18A,D ábra). Jóllehet a különböző dendrit szegmens hosszok mindkét populációban csökkenhettek, az apikális dendrit arborizáció összesített hossza csak a transzgenikus állatokban csökkent jelentős mértékben (18B,E ábra). Mindezen változások a Tg2576 egerekben radikális dendrit felszín csökkenéshez vezettek (18C,F ábra).

*Az önkéntes mozgásaktivitás morfogenetikai hatásai*

A nem kényszerített (önkéntes) fizikai aktivitás növeli a neuronális struktúrák plaszticitását, amely a dendritek morfológiájának átalakulásában is leképeződik (Nithianantharajah és Hannan, 2006; Stranahan és *mtsai*, 2007). Kimutatták, hogy az ingergazdag környezet csökkenti az amiloid lerakódást és az ehhez kapcsolódó kognitív képességek hanyatlását (Bimonte és *mtsai*, 2002; Lazarov és *mtsai*, 2005). Ezzel összhangban kimutatták, hogy a humán amiloid prékurzor fehérje expressziója transzgenikus egerekben növeli a környezet felfedezésére tett aktivitást (Senechal és *mtsai*, 2008). Kísérleteinkhez a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egértörzset választottuk, mely a vadttípusú humán amiloid prékurzor fehérjét magas (kétszeres) szinten expresszálja neuronjaiban, de az állatok egészen két éves korukig nem mutatnak plakk lerakódást az agyszövetben (Mucke és *mtsai*, 2000; Rockenstein és *mtsai*, 1995).

*A humán amiloid prékurzor fehérje expressziója PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egértörzsben, fizikai aktivitásban*

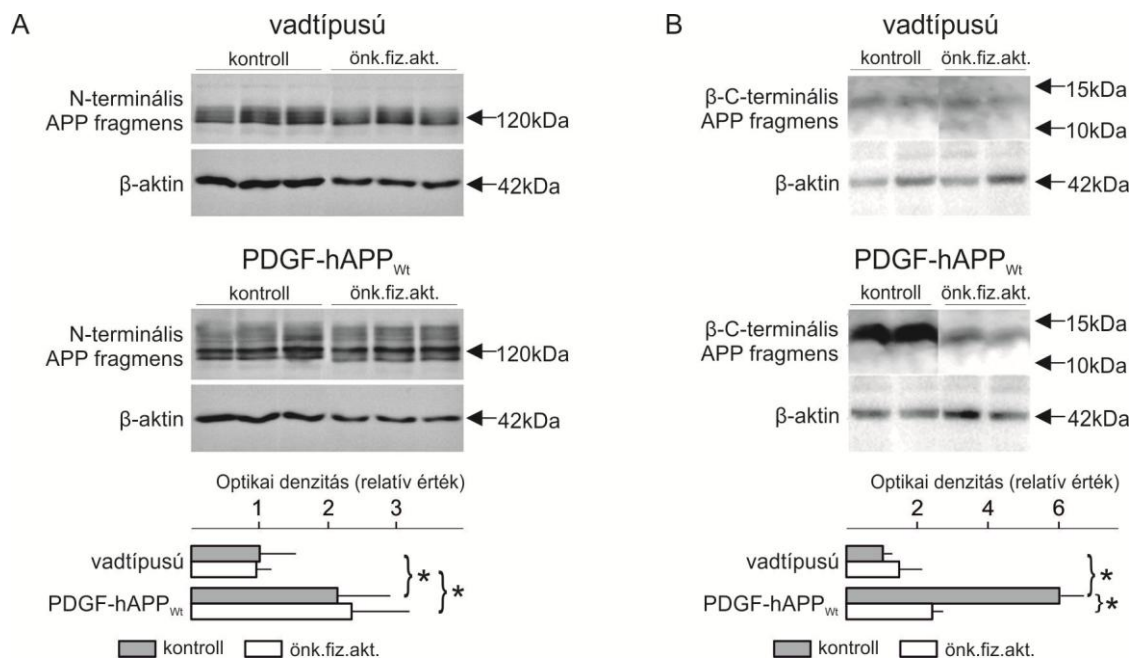
A transzgenikus állatokban a vadttípusú egyedekkel összehasonlítva kétszeres amiloid prékurzor fehérje expressziót (N-terminális fragmens) mértünk. Ha az állatok ketrecébe mókuskereket raktunk, ahová azok szabadon bemehettek, és futhattak, a



fehérje expressziója nem változott meg, sem a transzgenikus, sem a vad típusú populációban (19A ábra).

A teljes prékurzor fehérje mellett megvizsgáltuk azok fragmenseinek expressziós szintjeit is. Míg az  $\alpha$ -C-terminális fragmenst nem tudtuk detektálni, a  $\beta$ -C-terminális fragmens mennyisége hatszorosára növekedett a transzgenikus egerekben a vad típusú állatokhoz képest (19B ábra). Önkéntes fizikai aktivitás után ez a különbség a genotípusok között eltűnt, mert a kísérleti transzgenikus csoportban (fizikailag aktív állatok) a  $\beta$ -C-terminális fragmens expressziója drasztikusan csökkent a kontrollokhöz (mókuskereket a ketrecbe nem kapó transzgenikus) egerekhez képest (19B ábra).

Fehérje analízisünket a  $\beta$ -amiloid protein szintjeinek mérésével is kiegészítettük. Megállapítottuk, hogy a  $\beta$ -amiloid protein 1-40 és 1-42 izoformáinak szintje mind a genotípustól, mind a fizikai aktivitástól független volt. Az A $\beta$  1-40 protein mennyisége minimális ingadozással 0,16 pmol/mg szint körül alakult, míg az A $\beta$  1-42 protein mennyisége 0,34-0,40 pmol/mg volt. Ez megegyezik a korábban megállapított endogén fehérje tartalmakkal (Kawarabayashi és *mtsai*, 2001).



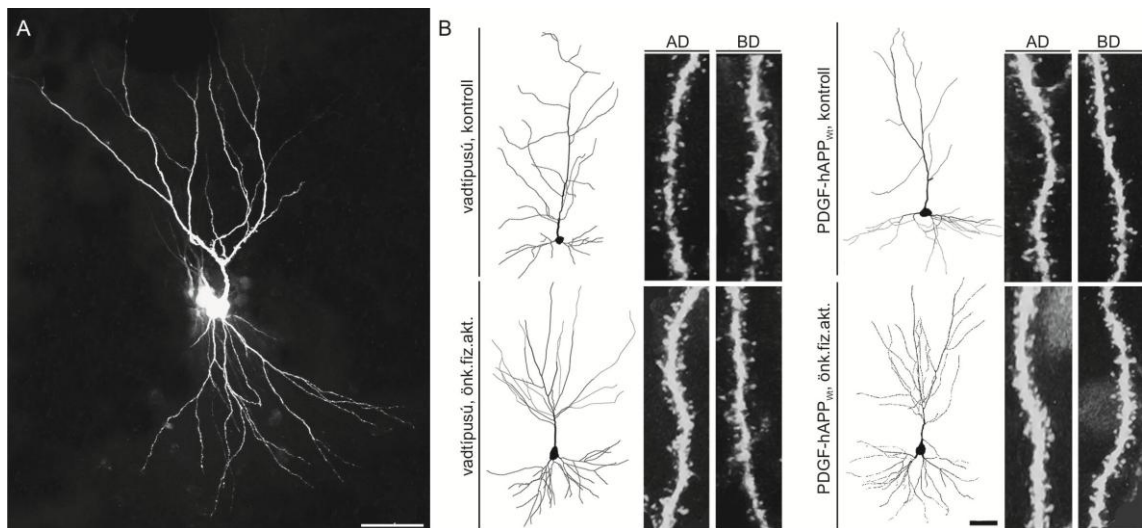
**19. ábra.** Az amiloid prékurzor fehérje N-terminális (A) és  $\beta$ -C (B) fragmens szintjének változásai önkéntes fizikai aktivitás után, PDGF-hAPP<sub>wt</sub> és azonos alombeli kontroll egerekben. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (A,B).

*A bazális és apikális dendritfák morfológiai és a dendrittűskék sűrűségének változásai a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egértörzsben*

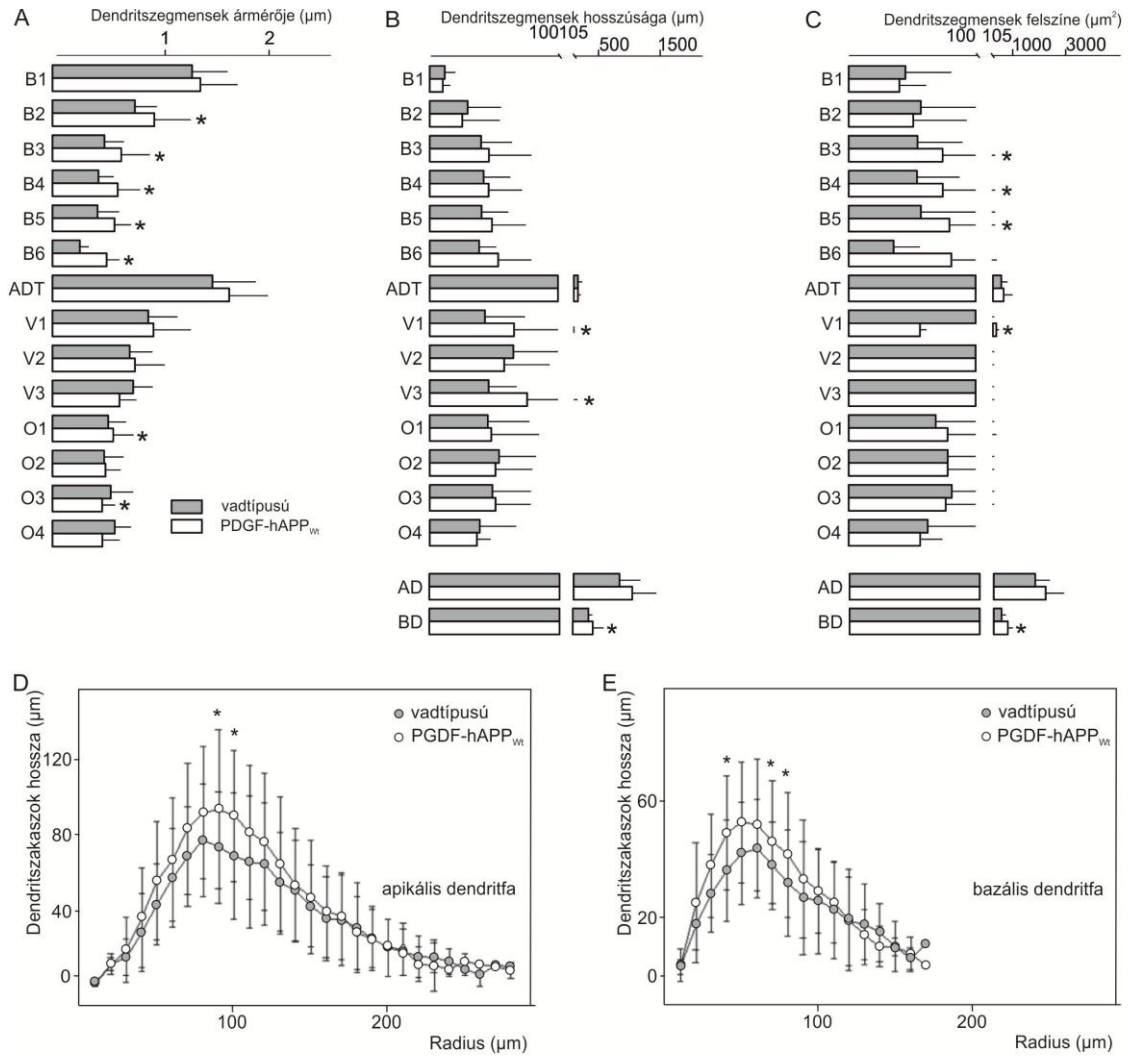
Az apikális dendritfa szegmenseivel szemben, melyek méretükben jelentős változást nem mutattak, a bazális dendritfák valamennyi szegmensének átmérője – az első szegmens kivételével – a transzgenikus állatokban jelentősen növekedett (20. és 21A ábra). Míg az egyes szegmensek hossza nem változott, a bazális dendritfa szegmenseinek összesített hossza a transzgenikus csoportban megnövekedett (21B ábra). Ezek a változások a bazális dendritfa intermedier szegmenseinek és összesített felszínének növekedéséhez vezetett a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egyedekben (21C ábra). A detektált trofikus hatás összecseng a B6-Py8.9 egértörzsben tapasztaltakkal.

Sholl analízissel kimutattuk, hogy mind a bazális, mind az apikális dendritfák intermedier régiójában a dendrit szakaszok összesített hossza a sejttesttől mért több távolságrádus(sáv)ban megnövekedett, a dendritikus denzitás növekedett (21D,E ábra).

Az apikális és bazális dendritfa intermedier szegmensein ugyanakkor nem találtunk változást a tűskék átlagos sűrűségében (20B ábra). A második, harmadik és negyedik bazális szegmenseken a 10  $\mu\text{m}$  dendrit hosszra számított tűskék száma nem mutatott genotipikus különbségeket (vad típusú:  $13,75 \pm 3,07$  vs. PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5:  $13,95 \pm 2,28$ ;  $p = 0,72$ ), hasonlóan az apikális dendritek oldalfácskáin mért eredményeinkhez (vad típusú:  $12,91 \pm 2,68$  vs. PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5:  $12,19 \pm 1,92$ ;  $p = 0,22$ ).



**20. ábra.** CA1 régióbeli piramisesejt konfokális lézer szkenneléses mikroszkópos (A) és Neurolucida programmal rajzolt (B) képe a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egértörzsben, kontroll állatokban és önkéntes fizikai aktivitás után. A nagy nagyítású felvételeken a dendrittűskék jól láthatók (B). Rövidítések: AD apikális dendrit, BD bazális dendrit. Lépték: 20  $\mu\text{m}$ .

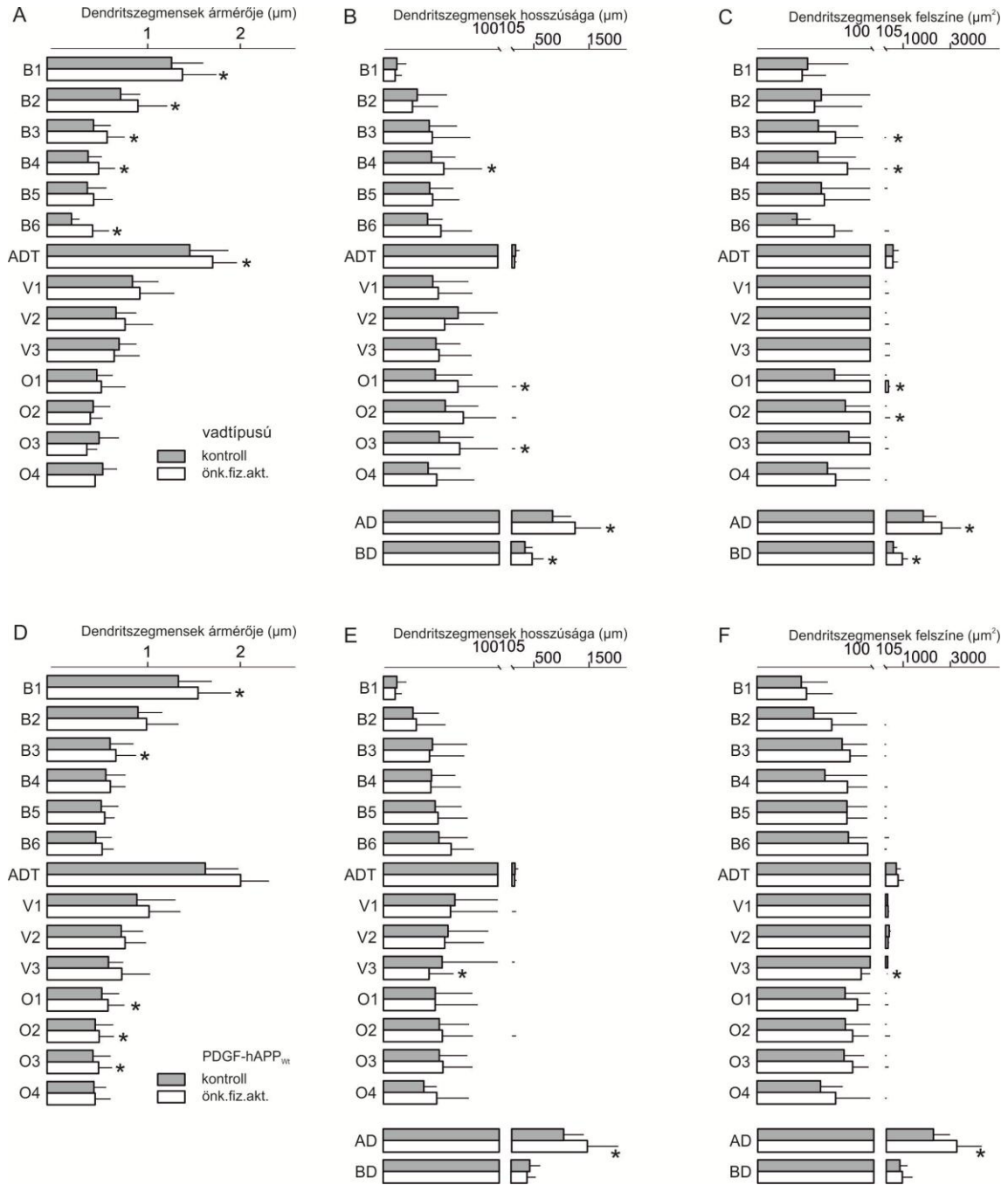


**21. ábra.** Az apikális és bazális dendritfa szegmenseinek főbb mennyiségi jellemzői a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> transzgenikus egerek CA1 régióbeli piramissejtjeiben, a hippocampusban. A bazális dendritszegmensek átmérőjének növekedése, és az arborizáció hosszának növekedése a dendritfa felszínének megnagyobbodását okozta (A-C). Az apikális (D) és bazális (E) dendritfák Sholl analízise az intermedier régió dendritdenzitásának növekedését mutatja. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-E).

*Az önkéntes fizikai aktivitás a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egértörzsben a vad típusú egyedekhez képest további dendritnövekedést nem okoz, a dendrittűskék sűrűségét ugyanakkor növeli*

Vadtípusú egyedekben az önkéntes fizikai aktivitás a bazális dendrit szegmensek és az apikális dendrittörzs átlagos átmérőinek jelentős növekedését idézte elő (22A ábra). A PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 állatok egyedeiben önkéntes fizikai aktivitás után a bazális dendrit szegmenseken ilyen kiterjedt változásokat nem figyeltünk meg, csak a harmadik szegmensben azonosítottunk statisztikailag jelentős, de kismértékű

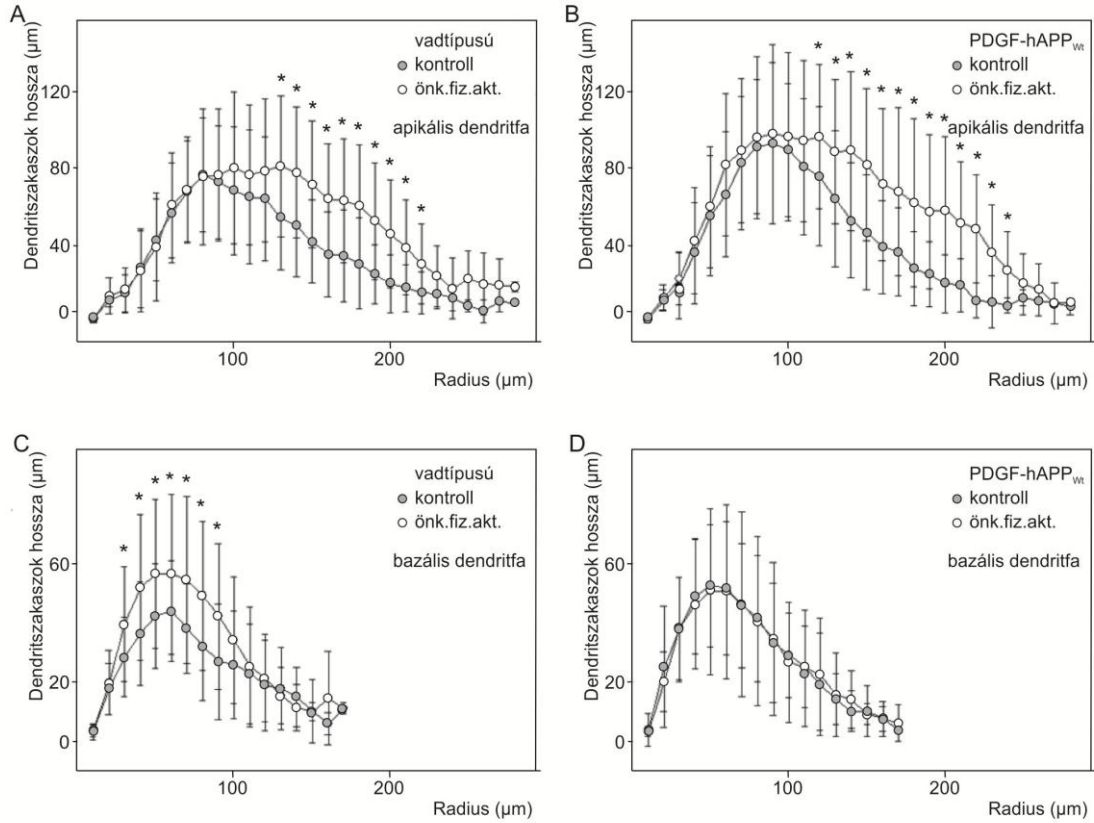
növekedést (22D ábra). Az apikális dendritfa oldalfácscsa szegmensek átmérői ugyanakkor nagyobbak lettek (22D ábra). A dendrit szegmensek hossza fizikai aktivitás után a genotípustól függetlenül nagyrészt változatlan maradt, csak vad típusú egyedekben figyeltünk meg néhány szegmensben növekedést (22B,E ábra). Az apikális dendritfa összesített dendrit hossza fizikai aktivitás után ugyanakkor genotípustól függetlenül megnövekedett, hasonló változást a bazális dendritfában csak a vad típusú egyedekben figyelhetünk meg (22B,E ábra). Ezzel összhangban változott az apikális és bazális dendritfák összesített felszíne is: önkéntes fizikai aktivitás után az apikális dendritfa felszíne a genotípustól függetlenül megnagyobbodott, míg a bazális dendritfa felszíne csak a vad típusú állatokban növekedett meg (22C,F ábra).



**22. ábra.** Hippokampális (CA1) piramissejtek dendritfa szegmenseinek főbb mennyiségi jellemzői önkéntes fizikai aktivitásban a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> transzgenikus egerekben (A-F). Az apikális dendritfa felszíne genotípustól függetlenül növekszik (C,F), a bazális dendritfa felszíne a vadtípusú állatokban megnagyobbodik (C). Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-F).

Sholl analíziseink arra világítottak rá, hogy fizikai aktivitás után az apikális dendritfában a dendritszakaszok összesített hossza a sejttesttől mért több távolságrádus(sáv)ban jelentősen növekedett, a változás a dendritfa intermedier és disztális részére korlátozódott (23A,B ábra). A bazális dendritfában ilyen irányú

változásokat csak a vad típusú egyedekben figyeltünk meg, annak intermedier régiójában (23C,D ábra).



**23. ábra.** Hippokampális (CA1) piramis sejtek apikális (A,B) és bazális (C,D) dendritfáinak Sholl analízise PDGF-hAPP<sub>wt</sub> transzgenikus egerekben, kontrollokban és önkéntes fizikai aktivitás után. Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-D).

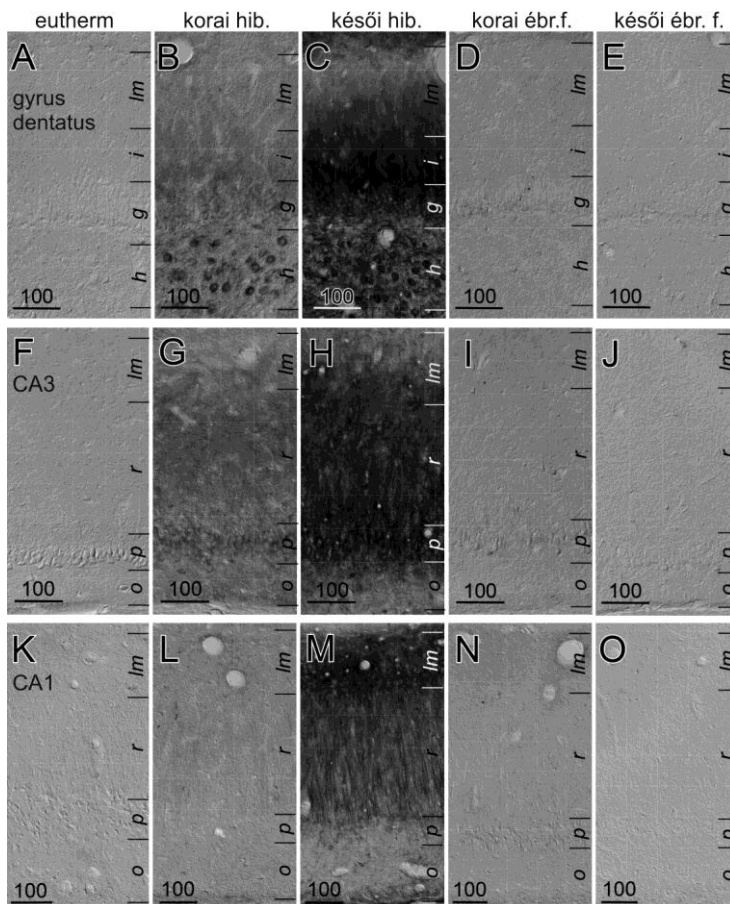
A dendrittűskék sűrűsége (10 μm hosszú dendritszakaszokon azonosított dendrittűskék száma) fizikai aktivitás után az apikális dendritfák oldalfácskáin a genotípustól függően jelentősen megemelkedett; (PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5:  $12,19 \pm 1,92$  a kontrollokban vs.  $16,65 \pm 2,65$  a kísérleti csoportban, \* $p = 0,0001$ ; vad típusú:  $12,91 \pm 2,21$  a kontrollokban vs.  $14,82 \pm 1,95$  a kísérleti csoportban, \* $p = 0,0001$ ). A bazális dendritszakaszokon ugyanakkor csak a transzgenikus csoport egyedein figyeltünk meg dendrittűske sűrűség növekedést fizikai aktivitás után (PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5:  $13,95 \pm 2,28$  a kontrollokban vs.  $18,09 \pm 0,41$  a kísérleti csoportban, \* $p = 0,0001$ ; a vad típusú populációban nem (vad típusú:  $13,75 \pm 3,07$  a kontrollokban vs.  $13,81 \pm 2,14$  a kísérleti csoportban,  $p = 0,9$ ).

#### 4.2. Strukturális és memória változások hibernációban

Az Alzheimer-kórban tapasztalt korai patológiás tau-foszforiláció hatását hibernációra képes állatokban vizsgáltuk. A szíria aranyhörcsög hippokampuszában az Alzheimer-kór korai fázisára jellemző neurofilament- és mikrotubulus változásokhoz hasonló, de reverzibilis változások mennek végbe.

##### Strukturális változások

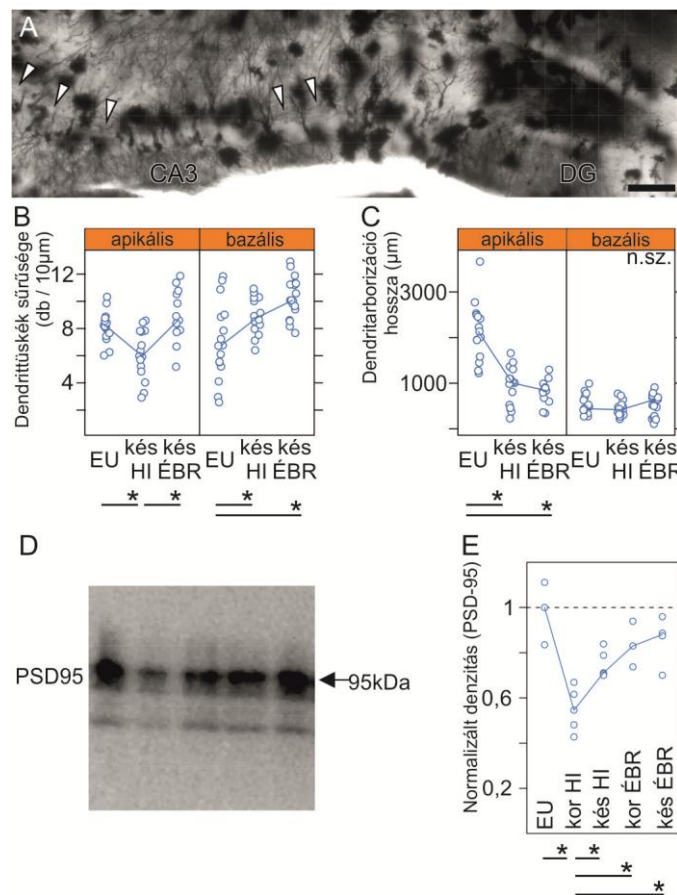
A hibernáció folyamán az inaktív hörcsögök hippokampuszában CA3 piramissejtjeinek morfológiáját vizsgáltuk meg. Az AT8 antitest egy olyan epitópot ismer fel, mely a neurofibrilláris degeneráció már korai fázisában („pre-tangle stage”) detektálható Alzheimer-kórban (E. Braak és *mtszai*, 1994). A sejtek testében és az apikális dendrit proximális részében az AT8-immunoreaktivitás megnövekedett, mely a hiperfoszforilált tau fehérje felhalmozódására utalt (24. ábra). A bazális dendritekben ugyanakkor nem találtunk változást az eutherm – a hibernáció jeleit nem mutató, fizikailag aktív - állatokhoz képest (24. ábra). Hasonló kompartment-specifikus változást találtunk a CA1 piramissejtek esetén is, és a gyrus dentatus szemcsesejtjei is erős AT8-immunopozitivitást mutattak hibernációban.



**24. ábra.** Hiperfoszforilált tau fehérje eloszlása a gyrus dentatusban (A-E), a CA3 régióban (F-J) és a CA1 régióban (K-O). Az apikális dendritek élénk AT8-immunoreaktivitása hibernációban és éles kontrasztban áll a bazális dendritek AT8-immunoreaktivitásának teljes hiányával (H,M). *Rövidítések:* g stratum granulosum, h hilus, lm stratum lacunosum moleculare, o stratum oriens, p stratum pyramidale, r stratum radiatum. *Lépték:* 100 µm (A-O).



Megvizsgáltuk, történt-e változás a neuronok dendritfájának kiterjedésében és dendrittüskékének sűrűségében. A Golgi-impregnált metszeteken végzett teljes apikális- és bazális dendritfa rekonstrukció azt mutatta, hogy a hibernációban lévő állatok piramissejtjeinek apikális dendritfája visszahúzódik, annak detektálható összesített hossza csaknem harmadára csökkent. A bazális dendritfán változást ugyanakkor nem találtunk (25A-C ábra). Az apikális dendritfán a hibernáció alatt a dendrittüskék sűrűsége csökkent, a hibernációs állapotból való ébredés után ugyanakkor az alvást megelőző állapotnál magasabbra ugrott. A dendrittüskék sűrűségének emelkedését ébredés után bazális dendriteken is megfigyeltünk (25B ábra).



**25. ábra.** Golgi impregnált metszetek hipokampusz metszetek CA3 régiójában (A, nyílhegyek) az apikális dendrittüskék sűrűsége hibernáció alatt csökken, majd ébredés után növekszik (B). Az apikális dendritfa hossza – szemben a bazális dendritekével – hibernáció alatt jelentősen csökken (C). A PSD-95 posztszinaptikus denzitás fehérje Western blot analízise eutherm, hibernációban lévő és ébredés utáni állatokban (D,E). ANOVA, \* $p < 0,05$  (B,C,E).

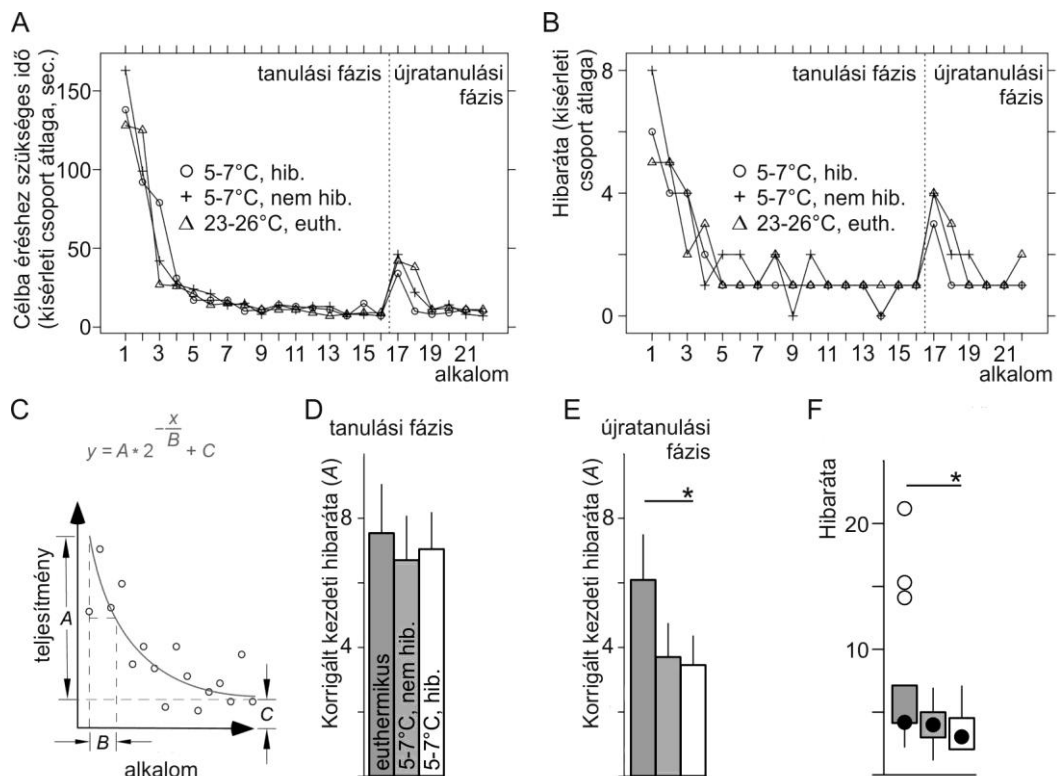
A dendrittüskék a serkentő szinapszisok posztszinaptikus kompartmentjei. Western blotting analízissel kimutattuk, hogy a posztszinaptikus kompartment receptor komplex egyik fő alkotó elemének, a PSD-95 fehérjének szintje a hibernációs periódus alatt csökken, majd ébredés után visszaáll a hibernáció előtti szintre (25D,E ábra).



A hideg- és szobahőmérsékleten tartott állatok testtömege nem különbözött ( $p=0,321$ , ANOVA), az a hibernáció létrejöttét nem befolyásolta ( $p=0,168$ , ANOVA).

### Labirintus teszt

A tanulási fázis során az állatok egyre rövidebb idő alatt találták meg a célt, és a keresés folyamán egyre kevesebb hibát vétettek. Ezekben a paraméterekben a később 23-26 °C-on tartott állatok, a 5-7 °C-on tartott hibernációba került és nem került állatok nem mutattak különbséget (26. ábra).



**26. ábra.** Szíriai aranyhörcsög kísérleti csoportok tanulási görbéi (A,B). Az exponenciális görbe (C) az individuális tanulási görbék alapján készül, ahol  $A$  a kezdeti érték,  $C$  a plató érték és  $B$  a tanulási ráta (az idő, mely alatt a kezdeti és platóérték közötti különbség feleződik). Jelentős különbségeket találtunk a tanulási görbe kezdeti hibarádjában a hibernáció után (E), a hibernáció előtt viszont nem (D).

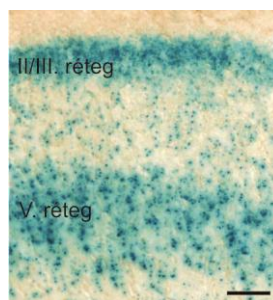
A 12 hét tesztmentes periódus után a 23-26 °C-on maradt, a 5-7 °C-on hibernációba került és a 5-7 °C-on hibernációba nem került állatok az újratanulási teszt során az első két alkalommal újra több hibát vétettek és a cél eléréséhez több időre volt szükségük. Megállapíthatjuk, hogy mindhárom kísérleti csoportba tartozó hörcsögök a feladatot gyorsan, az eredeti tanulási fázisban elért szinten újratanulták (26A,B ábra). Ugyanakkor, míg az alacsony hőmérsékleten tartott, hibernációba került és hibernációba nem került állatok között nem találtunk különbséget fenti

paraméterekben, a hibarása – meglepő módon – az alacsony hőmérsékleten tartottak között alacsonyabb volt, mint a 23-26 °C-on maradt állatok között (\* $p < 0,05$ , ANOVA) (26C-F ábra).

#### 4.3. A p21H-ras<sup>Val12</sup> fehérje expresszió hatása a differenciált agyvelőben

A citoszkeletális elváltozások vizsgálatát következő lépésünkben egy olyan egértörzsben folytattuk, melyben az Alzheimer-kór korai fázisára jellemző emelkedett neurotrofin szint szignáltranszdukciójában kulcsszerepet játszó enzim szintje magasabb szinten expresszálódik.

A p21H-ras<sup>Val12</sup> protein a neurotrofin jelátviteli mechanizmusokban azonosított G-fehérje, mely a neurodegeneratív betegségek, így az Alzheimer-kór patológiájában is fontos szerepet játszik (Gärtner és *mtsai*, 1999; Gärtner és *mtsai*, 1995), annak korai fázisában expressziója nő. A kísérletekhez választott transzgenikus egértörzs egyedei a tizennegyedik posztnatális naptól (P14) kezdik konstitutívan, magas szinten és a szinapszin-promoter régióhoz való kapcsoltságnak köszönhetően neuronspecifikusan expresszálni a transzgént, így hatását az már egy nagyban differenciált (nem a fejlődő) agykéregben fejti ki (Heumann és *mtsai*, 2000). Az Alzheimer-kórban elsősorban érintett piramissejtek különösen magas szinten expresszálják a transzgént, a reporter gén ( $\beta$ -galaktozidáz) aktivitását mutató hisztokémiai reakció kirajzolja a piramissejtek rétegét (27. ábra). A fejezet a transzgént expresszáló piramissejtek kompartmentjeinek (sejttest, dendrit, axon) morfológiai változásait, afferens és efferens kapcsolatainak módosulását, a transzgént nem expresszáló interneuronok adaptív változásait ismerteti.



**27. ábra.** Primer szomatoszenzoros kéreg koronális metszete p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben. X-gal festést alkalmaztunk a transzgén expressziójának kimutatására (*lacZ* reporter gén). Élénk expressziót a piramissejtek rétegében (II/III. és V. réteg) találunk. *Lépték:* 100  $\mu$ m.

**Szomatoszenzoros kéregben tett megfigyelések**

*A primer szomatoszenzoros kéreg p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egértörzs egyedeiben megnagyobbodik*

A primer szomatoszenzoros kéreg kiterjedését térfogat becsléssel és a kérdéses terület kraniális és kaudális határán mért felszínének nagyságával jellemeztük és hasonlítottuk össze a transzgenikus és vad típusú egyedek között.

A térfogati becslést a Cavalieri-féle elv alapján végeztük (Gundersen és Jensen, 1987). A vad típusú csoportban 8,4 mm<sup>3</sup>, a transzgenikus csoportban 10,8 mm<sup>3</sup> térfogatot mértünk, mely 28%-os növekedést jelentett (\* $p < 0,05$ ).

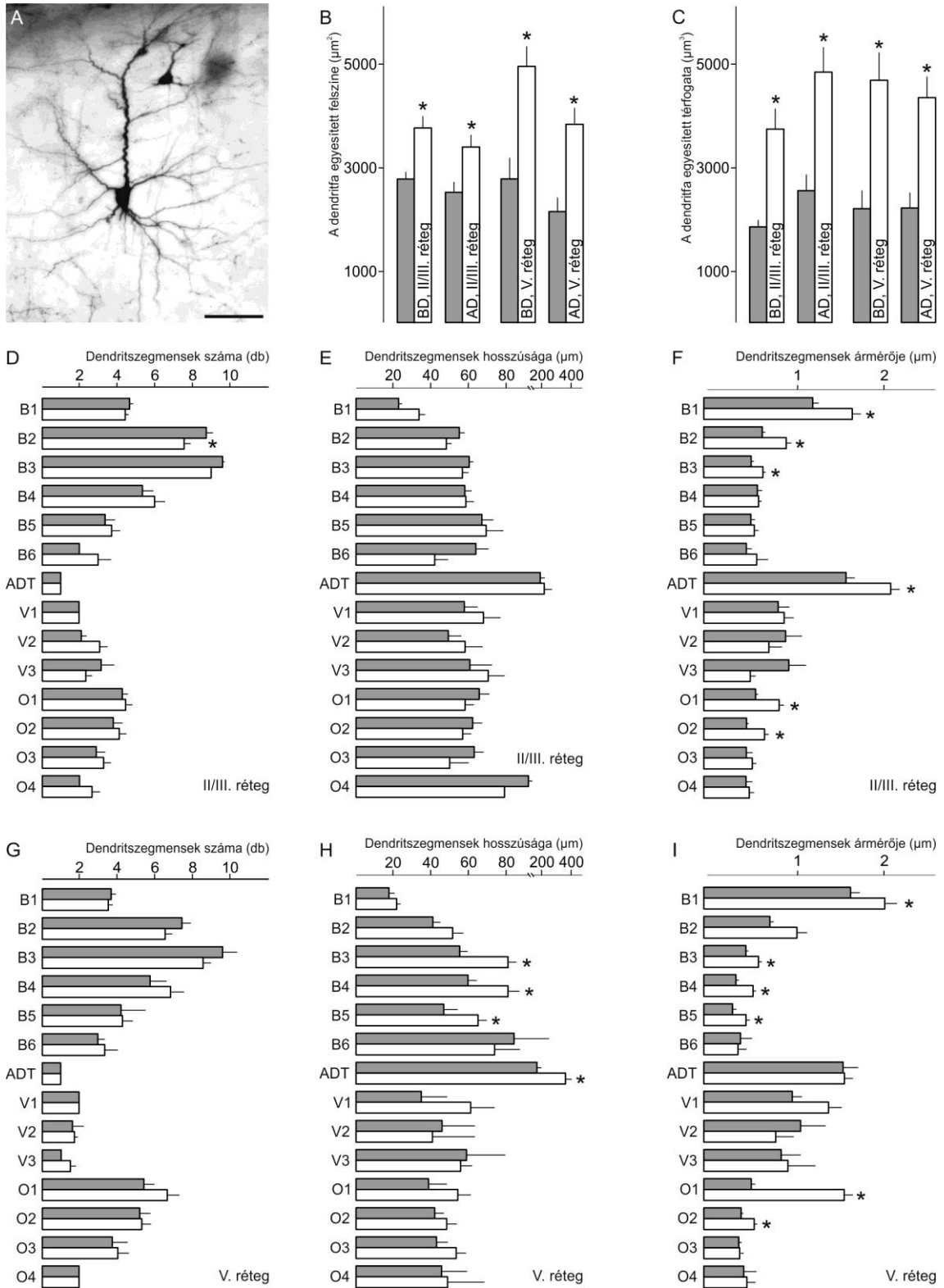
A koronális metszeti felszínnek nagysága hasonló változásokat mutatott. Ez az érték a commissura anterior magasságában a vad típusúakban 6,94 mm<sup>2</sup>, a transzgenikus állatokban 8,53 mm<sup>2</sup>, a hippocampus rostralis pólusa magasságában a vad típusú egyedekben 7,36 mm<sup>2</sup>, míg transzgenikus állatokban 9,3 mm<sup>2</sup> volt. A vad típusúakban átlagban ez 8,88 mm<sup>2</sup>, a transzgenikus állatokban 7,16 mm<sup>2</sup> metszeti felszínt jelentett, mely 25%-os növekedésnek felelt meg (\* $p < 0,05$ ).

**A dendritfa alaki változásai**

*A piramissejtek konstitutív p21H-ras<sup>Val12</sup> expressziója növeli a bazális dendritek méretét és arborizációjuk összetettségét*

Általános megfigyelésünk, hogy a transzgenikus állatokban a komisszurális piramissejtek mérete növekedett. Mind a II/III. (28A ábra), mind az V. rétegi piramissejtek sejttesteinek kerülete és metszeti felszíne ezekben az egyedekben nagyobb volt, mint a vad típusú állatokban (7. táblázat). A megnagyobbodott dendritfát (8. és 9. táblázat, 28B,C ábra) részletes, több szempontú vizsgálat tárgyává tettük.

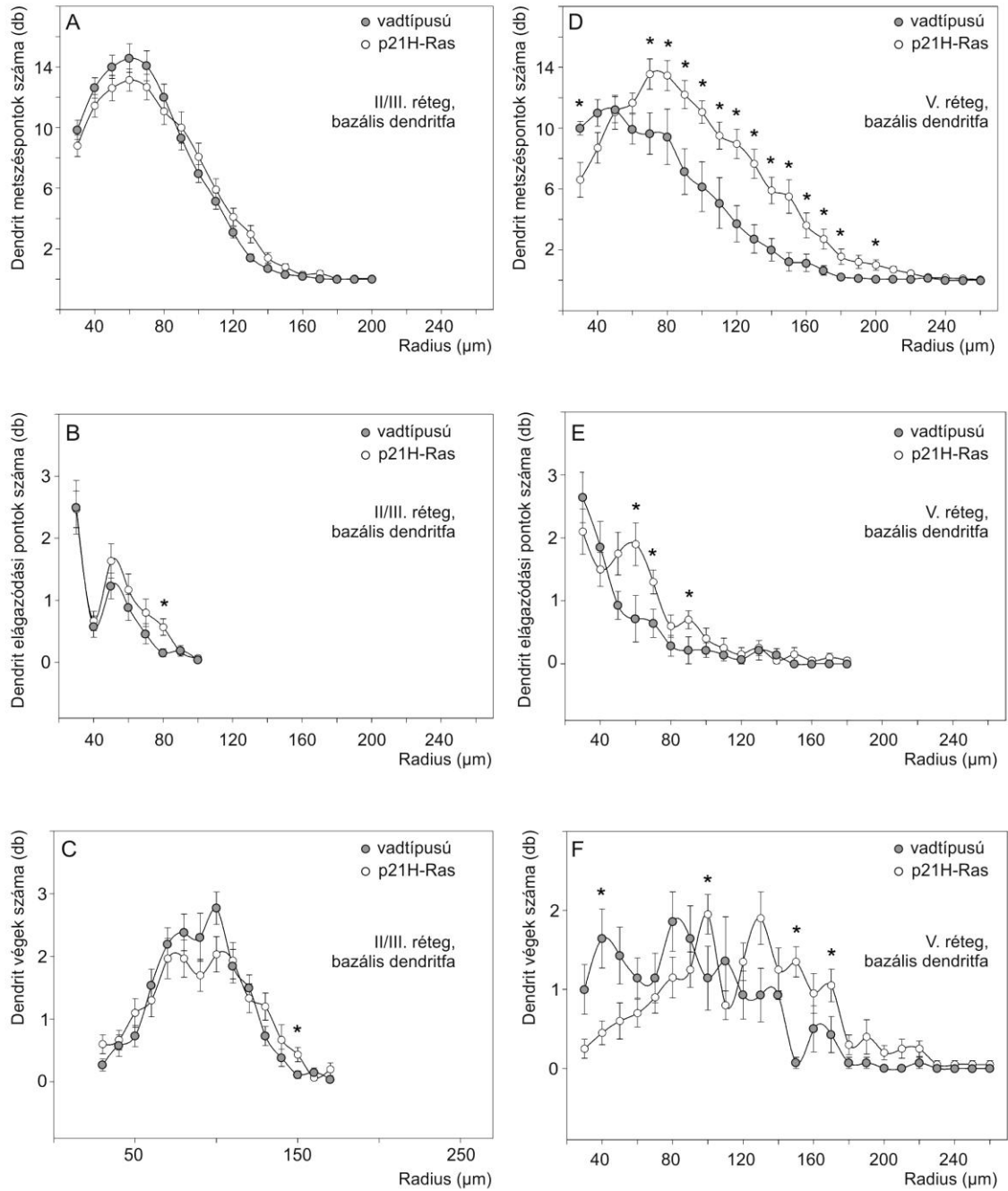
A bazális dendritekkel kapcsolatos fő megállapításunk, hogy azok összesített felszíne és volumene a transzgenikus állatok csoportjában mindkét vizsgált rétegben jelentősen megnőtt (28B,C ábra). Ezt a változást legfőképp az átlagos átmérő megnövekedése (28F,I ábra), az V. rétegi piramissejtek esetében az intermedier szegmensek hosszának növekedése is okozta (28H ábra). Ezzel összhangban ugyanezen rétegben a Sholl analízissel vizsgált dendritikus denzitás a transzgenikus állatokban magasabb értéket mutatott (29A,D ábra).



**28. ábra.** Retrográd feltöltött komisszurális piramisisejtek (A), mennyiségi jellemzői a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben. A bazális és apikális dendritfák egyesített felszíne (B) és térfogata (C) jelentősen megnövekedett. A dendritszegmensek száma nem változott (D,G), hosszuk az V. rétegi idegsejtek esetén növekedett (E,H). A dendritszegmensek átmérői mind a II/III. mind az V. rétegi piramisisejtekben megnövekedtek (F,I). Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (B-I). Lépték: 50  $\mu\text{m}$ .

A II/III. rétegben jelölt piramis sejtek bazális dendritfa analízisével kimutattuk, hogy a dendrit szegmensek száma jelentősen nem változik (28D ábra), a transzgenikus egyedekben ugyanakkor többedik szegmensek is megjelentek; így hetedik szegmenst hét transzgenikus, de csak egy vad típusú állatból mért sejten azonosítottunk, nyolcadik szegmens pedig csak a transzgenikus csoportból vizsgált két piramis sejten figyeltünk meg. Transzgenikus állatokban a piramis sejtek bazális dendritjein az első három szegmens átmérője, felszíne és térfogata nagyobbak voltak (8. táblázat, 28E,F ábra). Ezek a változások a teljes bazális dendritfa méretét (felszínét és térfogatát) rendkívüli mértékben megnövelték (28B,C ábra). A dendritszakaszok számát, a dendritek elágazódásainak és végződéseinek számát a sejtestől mért távolság függvényében is megvizsgáltuk Sholl analízisek segítségével. Ezek eloszlása a genotípusok között nem mutatott különbséget (29A-C ábra).

Az V. rétegi piramis sejtek dendritjeinek mennyiségi mutatói még markánsabban változtak. Míg a szegmensek száma nem változott (28G ábra), legtöbbjük átmérője megnövekedett (28I ábra), az intermedier szegmensek hossza pedig a transzgenikus állatokban nyert mérési adatokban magasabb lett (28H ábra). Ez a dendrit szegmensekben következményes felszín- és volumennövekedéshez vezetett (9. táblázat), mely összesítve a teljes bazális dendritfa felszínét és térfogatát több mint kétszeresére növelte (9. táblázat, 28B,C ábra). A II/III. rétegi piramis sejtekhez hasonlóan disztális szegmensek gyakrabban fordultak elő a transzgenikus csoportban: hetedik szegmenst a transzgenikus csoportban hat, a vad típusú csoportban két sejten, nyolcadik és kilencedik szegmenseket három, illetve két sejten csak a transzgenikus populációban regisztráltunk. A II/III. rétegi piramis sejtekben megfigyeltekkel ellentétben az V. rétegben a Sholl analízisek jelentős különbségekre világítottak rá. A dendritikus denzitást jellemző dendrit metszéspontok száma vad típusú állatokban a sejtestől 30-50  $\mu\text{m}$  távolságban mutatta a legnagyobb értéket, a transzgenikus csoportban ez a 70-80  $\mu\text{m}$ -es tartományra esett, és egészen a 200  $\mu\text{m}$ -es távolságig a vad típusú sejtekben regisztráltakhoz képest magasabb értéket mutatott (29D ábra). Mind a dendrit elágazódások, mind a végzések száma több rádiussávban jelentősen magasabb volt a transzgenikus, mint a vad típusú csoportban (29E,F ábra).



**29. ábra.** II/III és V. rétegi komisszurális piramisisejtek bazális dendritfáinak Sholl analízise p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben. Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-F).

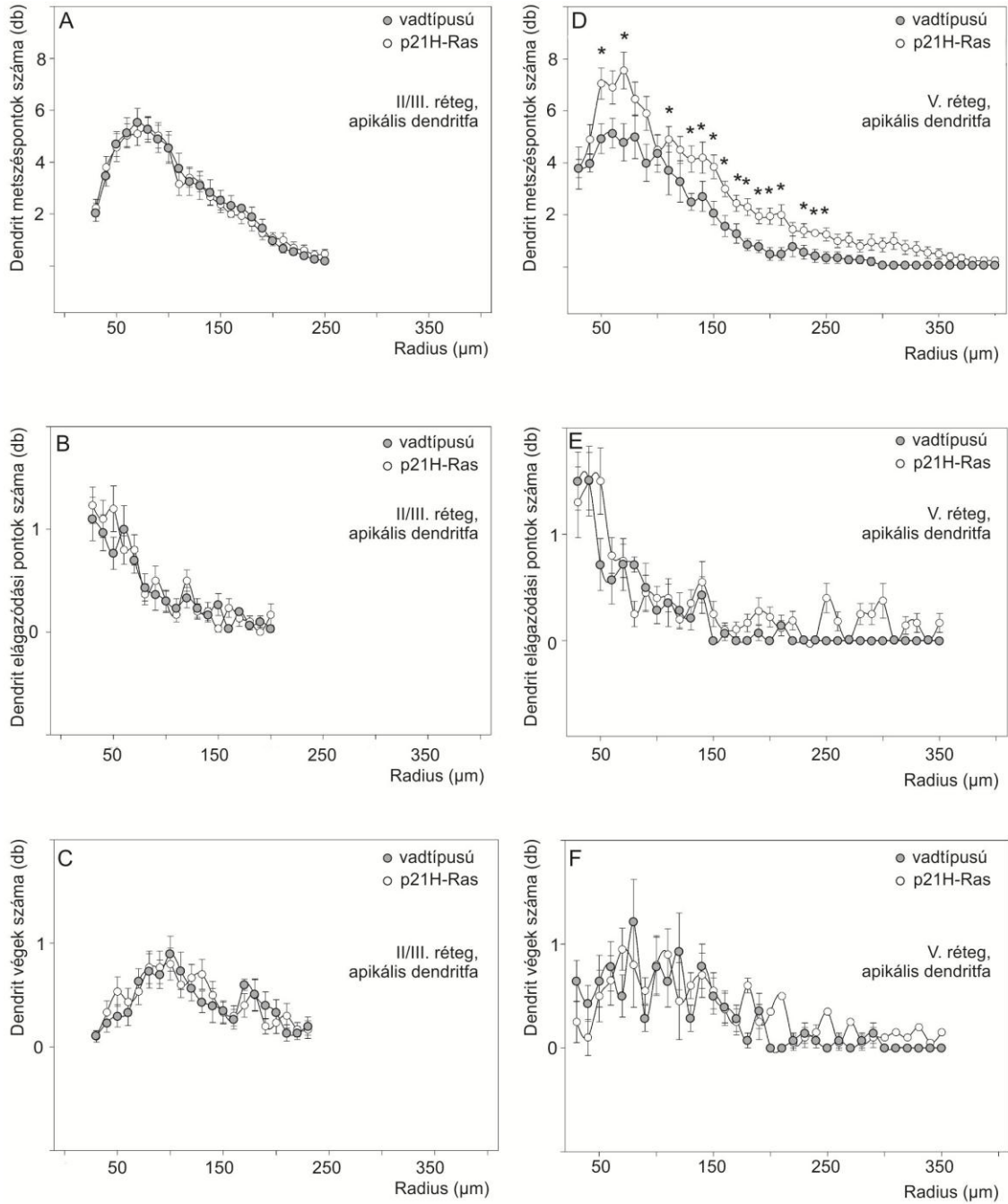
*A piramisisejtek apikális dendritfái a transzgenikus csoportban a bazális dendrit arborizációban találtakhoz hasonló változásokat mutatnak*

A transzgenikus populációban mind a II/III., mind az V. rétegi piramisisejtek apikális dendritfája jelentős méretbeli növekedést mutatott, amit a dendrit szegmensek átmérőjének növekedése okozott (8. és 9. táblázat, 28B,C ábra). Az V. rétegi

piramissejtek dendritjei gazdagabb arborizációt alkottak ugyanebben a csoportban (30D ábra).

A II/III. réteg piramissejtek apikális dendritfa szegmenseinek száma és hossza változatlan maradt (8. táblázat, 28D,E ábra). A dendrittörzs és az oldalfácskák első két szegmensének átmérője (8. táblázat, 28F ábra), és következményesen felszíne és térfogata a transzgenikus állatokban megnövekedett (8. táblázat). A dendrit metszéspontok, elágazódási pontok és dendritvégek száma a sejttesttől mért különböző távolságokban változatlan maradt (30A-C ábra).

A dendrit szegmensek száma és hossza az V. rétegi piramissejteken sem változott (28G,H ábra), a dendrittörzs ugyanakkor jelentősen meghosszabbodott (28H ábra). A dendrittörzs alapi átmérője és az oldalfácskák első két szegmensének átlagos átmérője (28I ábra), következményesen felszíne és térfogata a transzgenikus állatokban ugyanakkor nagyobb lett (9. táblázat). Sholl analíziseink szerint míg az elágazódási pontok és a dendritvégek száma a sejttesttől mért távolság függvényében nem változott (30E,F ábra), a dendritszakaszok száma az intermedier régió egészen magasabb volt a transzgenikus csoportban (30D ábra).



**30. ábra.** II/III és V. rétegi komisszurális piramisjelek apikális dendritfáinak Sholl analízise p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben. Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-F).

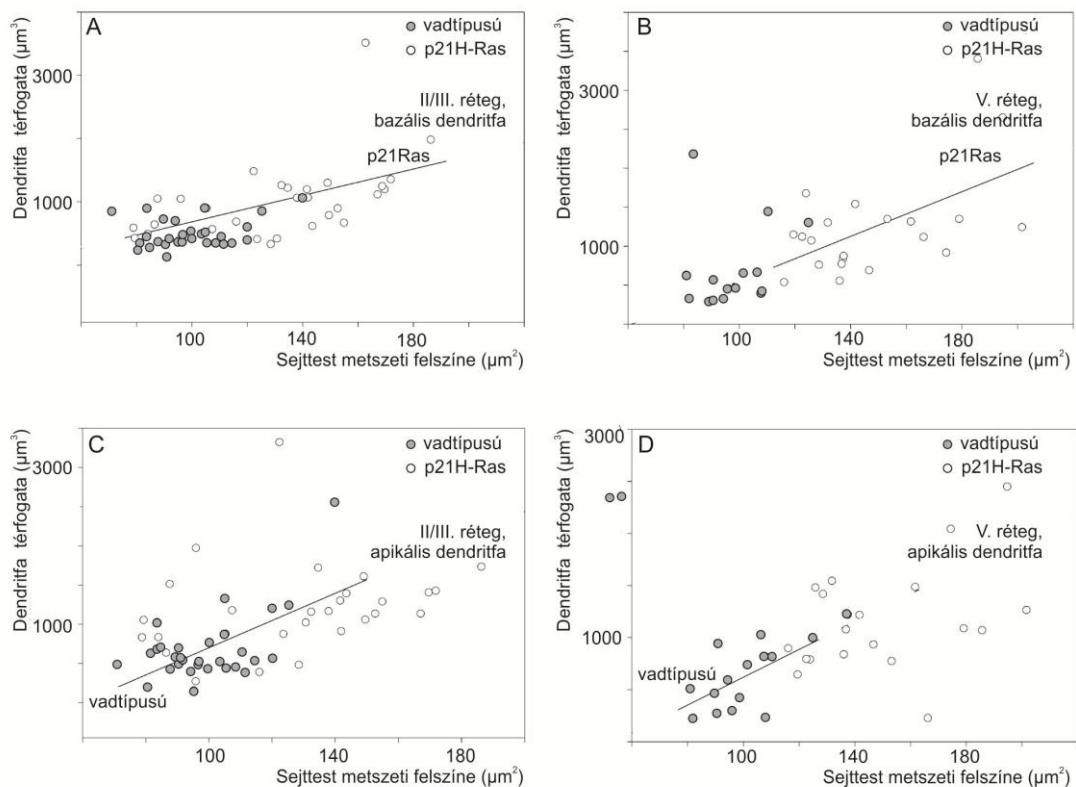
*A bazális és apikális dendritfák növekedése nem változtatja meg azok általános geometriáját a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egértörzs agykérgi piramisjeleiben*

Korábbi tanulmányok szerint a dendritek paraméterei – átmérő, hosszúság, felszín, térfogat – egymástól nem függetlenül változnak a dendritfán belül. Ezen korrelációs



vizsgálatok a dendrit geometria általános felépítési elveit híven tükrözik (Larkman, 1991a, 1991b). Megvizsgáltuk, megváltoztatja-e a p21H-ras<sup>Val12</sup> fehérje konstitutív, magas szintű neuronális expressziója a piramisisejtek dendritfájának általános felépítési mintáját, elvét. Ehhez a sejttest méretét, a dendritfa alapi átmérőjét és a végződések számát korreláltattuk egymással.

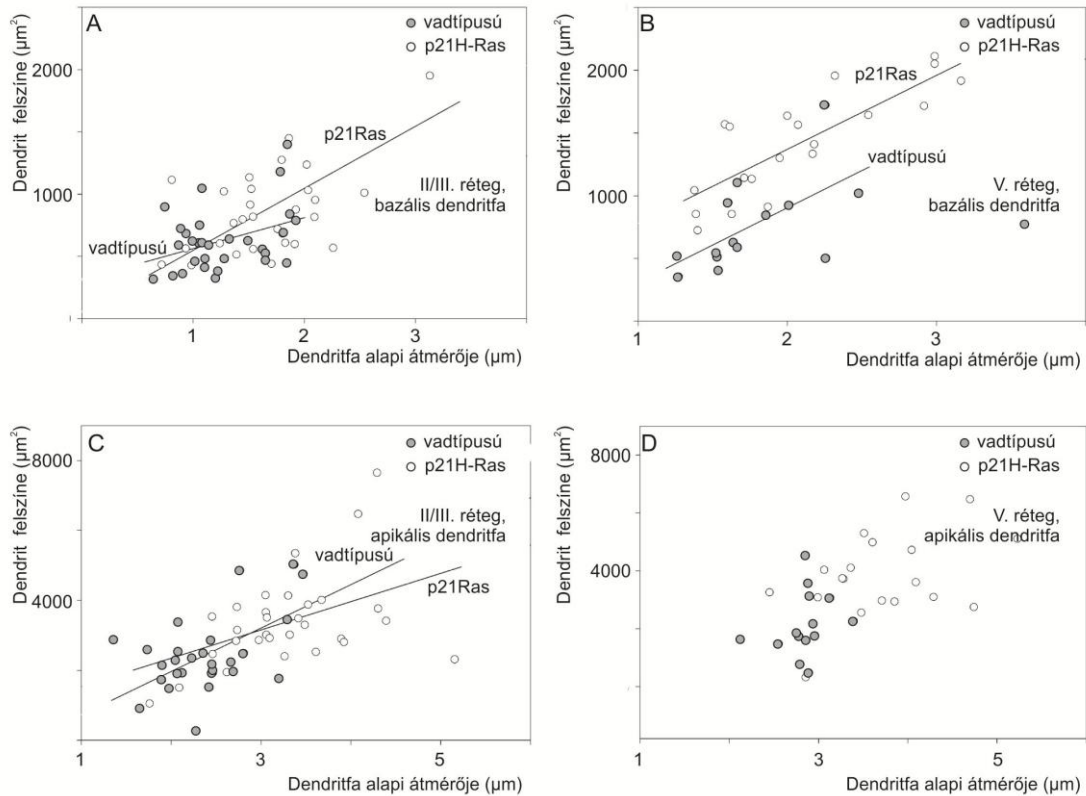
Mindkét rétegi piramisisejten megfigyeltük, hogy a bazális dendritfa térfogata pozitívan korrelál a sejttest méretével (metszeti felszínével) a transzgenikus csoportban, míg a vad típusú populációban nem (31A,B ábra). A pozitív korreláció megléte az apikális dendritfa és a sejttest mérete között a genotípusok között viszont ellenkezően alakult (31C,D ábra).



**31. ábra.** Sejttest metszeti felszínének és a dendritfák térfogatának korrelációs analízise p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben. A bazális dendritfák térfogata a transzgenikus állatok neuronjaiban (A,B), az apikális dendritfák térfogata a vad típusú egerek neuronjaiban (C,D) korrelált a sejttest méretével. Lineáris regresszió \* $p < 0,05$  (A-D).

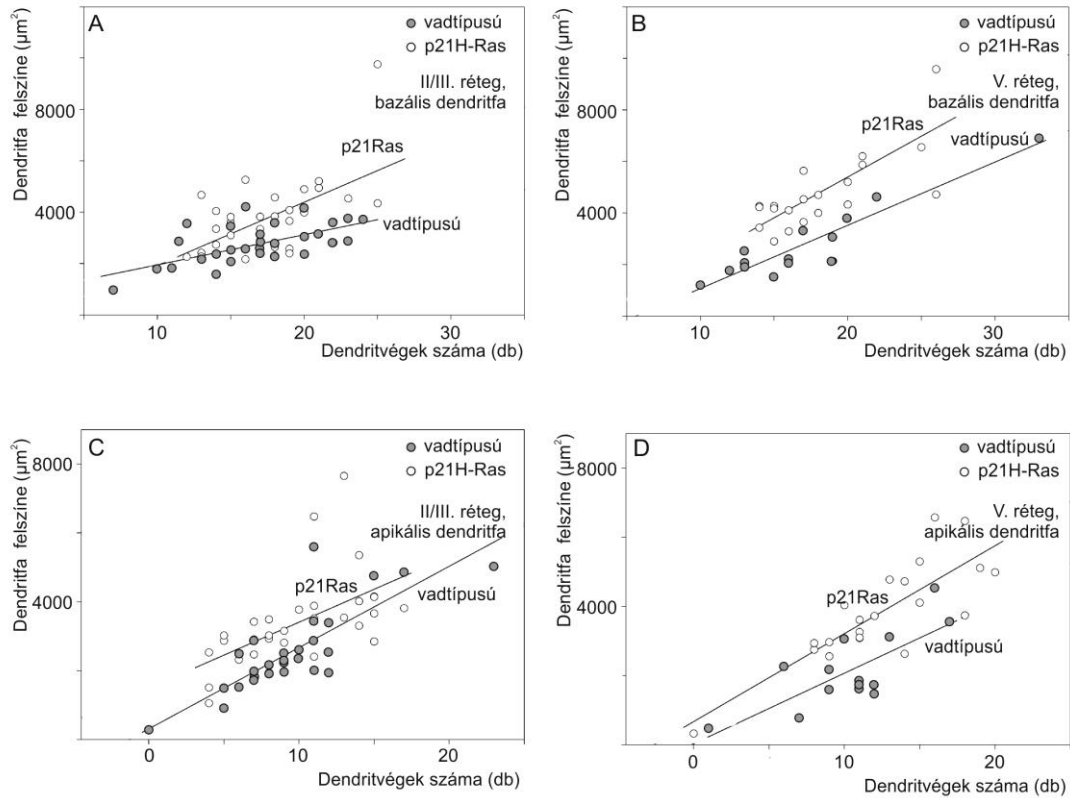
A bazális dendritfa teljes felszíne genotípustól függetlenül pozitívan korrelált annak alapi átmérőjével mindkét rétegi piramisisejtek esetén (32A,B ábra). Megfigyeltük, hogy ugyanazon alapi átmérő értékhez transzgenikus állatokban nagyobb dendritikus felszín tartozott (32A,B ábra). Az apikális dendritfa felszíne hasonlóképp függött annak alapi

átmérőjétől a II/III. rétegi piramisisejteknél, mindkét kísérleti csoportban (32C ábra), míg nem találtunk korrelációt ezen változók között az V. rétegi piramisisejtek esetén egyik populációban sem (32D ábra).



**32. ábra.** A dendritfa alapi átmérőjének és felszínének korrelációs analízise p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben. Lineáris regresszió \* $p < 0,05$  (A-D).

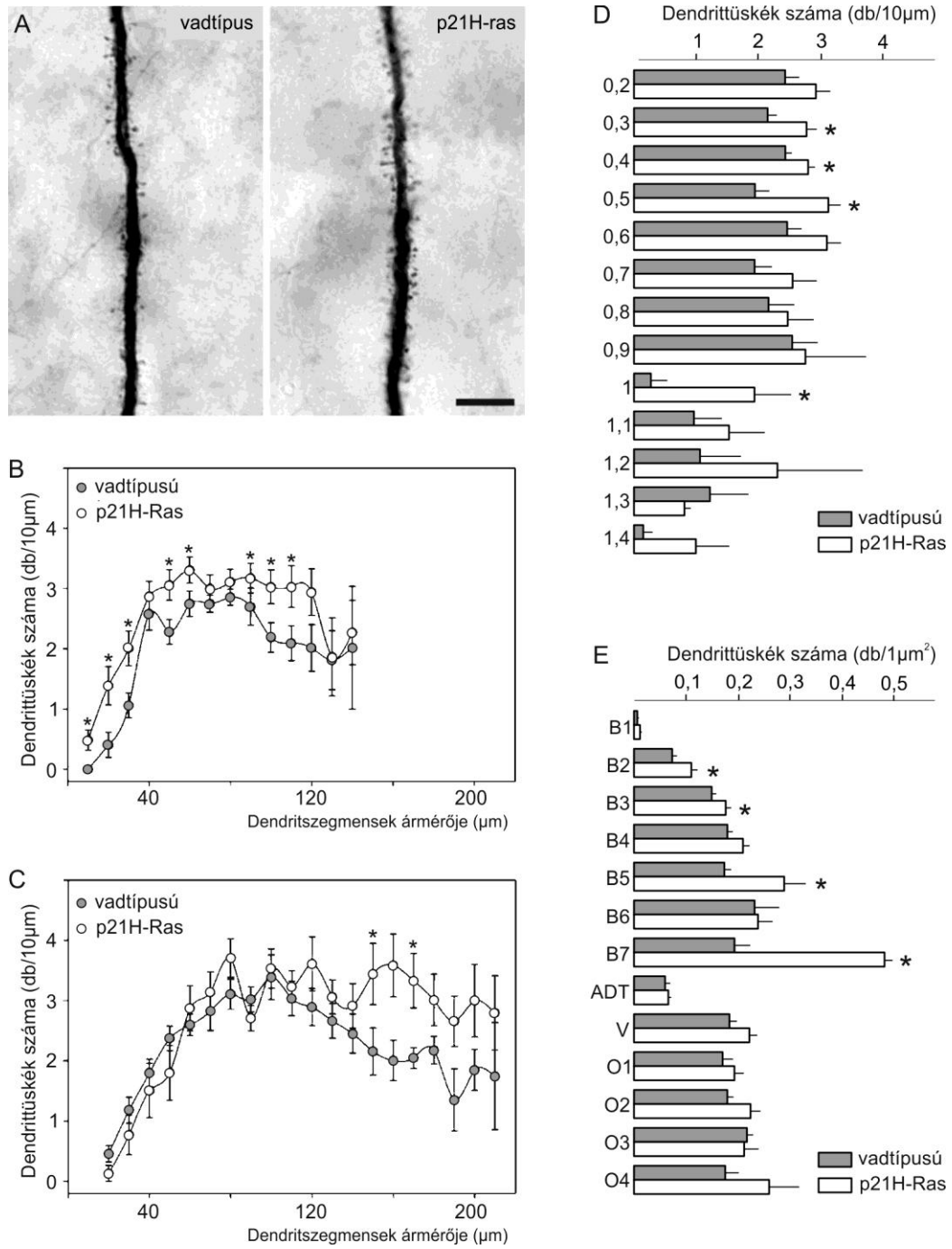
Valamennyi kísérleti csoportban és rétegben a bazális és apikális dendritok felszíne szorosan és pozitívan korrelált a dendritvégek számával (33A-D ábra). A transzgenikus csoportban megegyező számú dendritvéghez nagyobb dendritfelszín tartozott (33A-D ábra).



**33. ábra.** A dendritvégek számának és felszínének korrelációs analízise p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben. Mindkét rétegben és dendritfa típusban találtunk összefüggést, transzgenikus állatokban megegyező számú dendritvéghez nagyobb dendritfelszín tartozott. Lineáris regresszió \* $p < 0,05$  (A-D).

*A p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egértörzs agykérgi piramissejtjein a dendrittüskék sűrűsége növekszik*

A dendrittüskék (34A ábra) egységnyi dendrithosszra (10  $\mu\text{m}$ ) eső számát több szempontból is elemeztük. Sholl analízissel a sejtesttől való távolság függvényében hasonlítottuk össze adatainkat a bazális és apikális dendriteken. Megállapítottuk, hogy a transzgenikus csoportban a dendrittüske sűrűség a bazális dendritek egész területén (34B ábra), míg az apikális dendritek disztális régiójában megnövekedett (34C ábra). Az egységnyi dendrithosszra eső dendrittüskék számát a különböző átmérőjű dendrit szegmenseken is megvizsgáltuk. Több megegyező átmérőjű dendrit szakaszon magasabb értéket találtunk a transzgenikus csoportban a vadtípusú állatokban mértékhez képest (34D ábra). A dendrittüskék sűrűségét a különböző dendrit szegmenseken is összehasonlítottuk (34E ábra). Különbségeket csak a bazális dendritek esetén találtunk, transzgenikus állatokban azok második, harmadik, ötödik és hetedik szegmensén a dendrittüskék sűrűsége magasabb értéket mutatott (34E ábra).



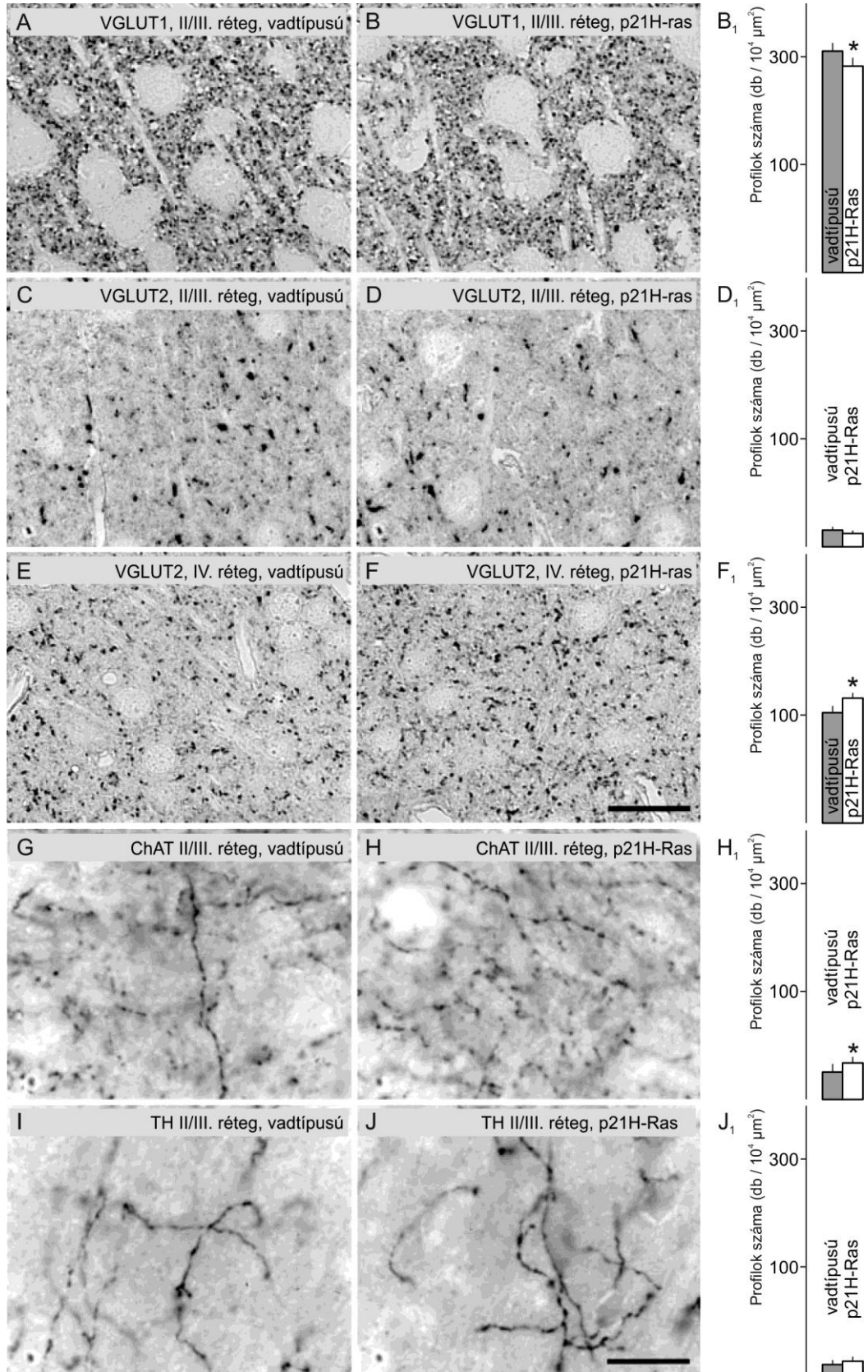
**34. ábra.** A dendrittüskék (A) sűrűsége a bazális (B) és apikális (C) dendritek Sholl analízise szerint a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben megemelkedett. Az átmérő (D) és szegmens (E) szerinti elemzés hasonló eredményt mutatott. Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (B-E). Lépték: 5 µm.

Nem találtunk genotípus szerinti gyakorisági különbséget a dendrittüskék alaki előfordulása között. A vékony (thin; vadtípusú: 56,34% vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 57,16%), gomba-alakú (mushroom-shaped; vadtípusú: 28,91% vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 27,41%) és

tompá alakú (stubby; vad típusú: 14,74% vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 15,43%) típusú dendrittüskék azonos gyakorisággal fordultak elő mindkét kísérleti csoportban.

### ***A neokortikális afferensek mennyiségi változásai***

A kérgi glutamáterg serkentő szinapszisok működését a preszinaptikus vezikuláris glutamát transzporterek segítik. 1-es (VGLUT1) és 2-es típusuk (VGLUT2) a nagyagykéregben komplementer eloszlást mutat, a VGLUT1 az intra- és interhemiszférikus végződéseken, míg a VGLUT2 a talamokortikális végződéseken fordul elő (Kaneko és Fujiyama, 2002). Félvékony metszeteken (35A-F ábra) megállapítottuk, hogy transzgenikus állatokban a megnagyobbodott primer szomatoszenzoros kéreg II/III. rétegében a VGLUT1<sup>+</sup> profilok sűrűsége csak 6%-kal csökken (10. táblázat, 35A-B<sub>1</sub> ábra), míg a VGLUT2<sup>+</sup> profilok sűrűsége a IV. rétegben 15%-kal nő (10. táblázat, 35E-F<sub>1</sub> ábra).



**35. ábra.** VGLUT1<sup>+</sup> (A-B<sub>1</sub>), VGLUT2<sup>+</sup> (C-F<sub>1</sub>), ChAT<sup>+</sup> (G-H<sub>1</sub>) és TH<sup>+</sup> (I-J<sub>1</sub>) profilok és sűrűségük p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerek szomatoszenzoros kérgének II/III. és IV. rétegében. Átlag ± standard hiba, \*p < 0,05 (B<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>, J<sub>1</sub>). Lépték: 20 μm (A-J).

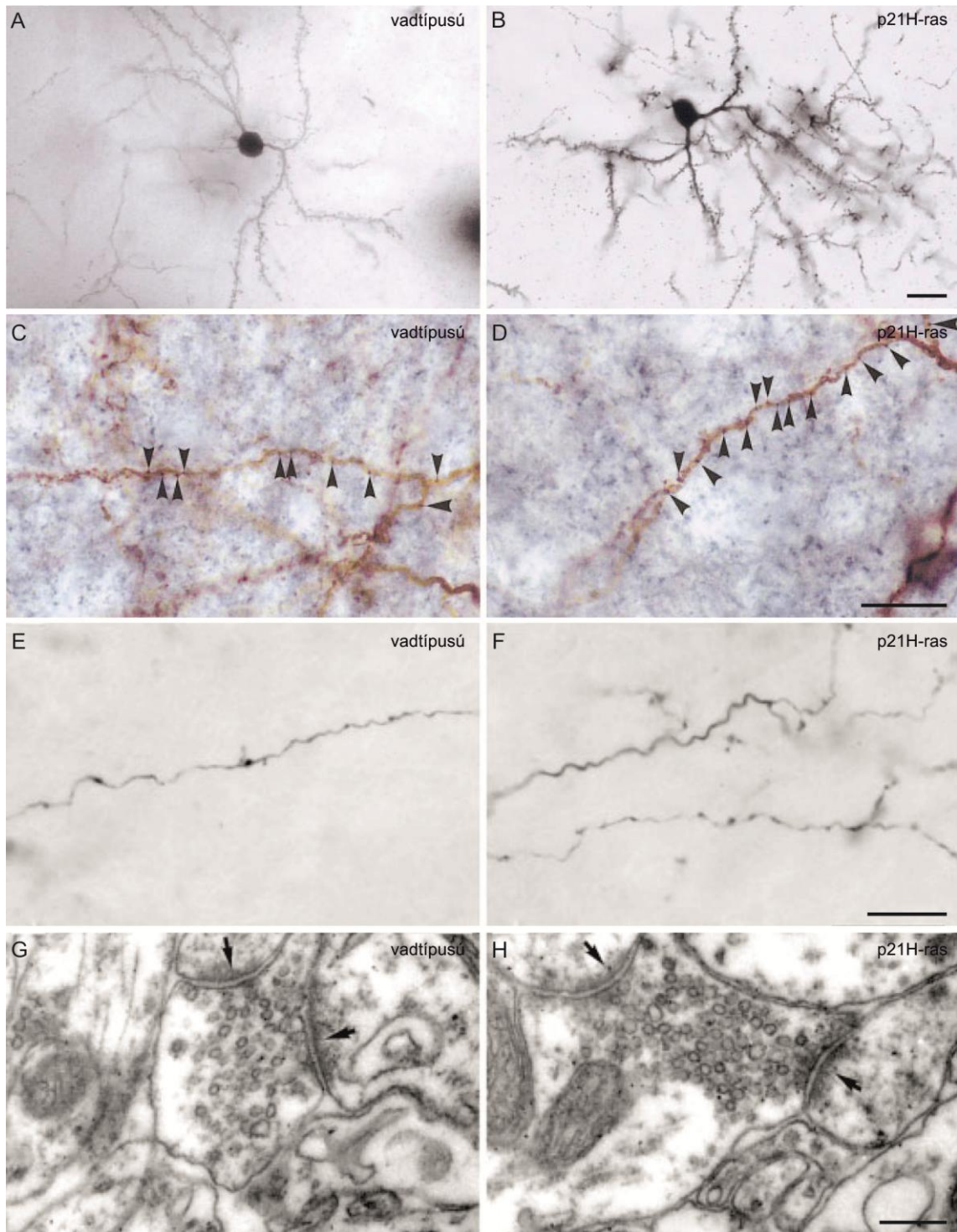
Következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a p21H-ras<sup>Val12</sup> egerekben megnövekedett VGLUT2<sup>+</sup> terminális sűrűség a talamokortikális afferensek fő célsejt típusával, a talamikus tüskés neuronok (spiny stellate cells), vagy a transzgént expresszáló piramissejtekkel hozható kapcsolatba. A Golgi-impregnációval láthatóvá tett tüskés neuronok (36A,B ábra) egyetlen vizsgált morfológiai paramétere sem mutatott változást, a sejtestet metszeti felszíne, dendritfáinak hossza és felszíne, a dendrittüskék sűrűsége genotípustól független volt (11. táblázat). Ezzel szemben a retrográdan feltöltött III. rétegű piramissejtek bazális dendritjei mentén, melyek a IV. rétegbe terjedtek, a VGLUT2<sup>+</sup> profilok (36C,D ábra) egységnyi (10  $\mu$ m) dendrithosszon megállapított száma a transzgenikus állatokban magasabb volt (vad típusú:  $2,12 \pm 0,12$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $3,01 \pm 0,12$ ,  $*p < 0,05$ ).

A nemspecifikus afferensek közül a kolinerg és katekolaminerg terminálisokat mennyiségi változásait vizsgáltuk (35G-J ábra). Míg a TH<sup>+</sup> katekolaminerg butonok sűrűsége a megnagyobbodott kérgi területen nem változott (11. táblázat, 35I-J<sub>1</sub> ábra), a ChAT<sup>+</sup> kolinerg terminálisok sűrűsége ugyanezen területen 29%-kal növekedett (11. táblázat, 35G-H<sub>1</sub> ábra).

A transzgént expresszáló piramissejtek feltöltött axonján varikozitásokat figyeltünk meg (36E,F ábra), melyek az *en-passant* butonok helyét jelölik (Stettler és *mtsai*, 2006). A varikozitások közötti távolság (varicosity spacing) a kommissurális axonokon 50%-kal, a kortikostriatalis axonokon 35%-kal csökkent a transzgenikus csoportban (12. táblázat). A ChAT<sup>+</sup> és TH<sup>+</sup> rostokon a varikozitások közötti távolság a genotípustól ugyanakkor nem függött (12. táblázat).

A szinaptikus plaszticitás terminálisok számának növelése nélküli lehetősége a többszörös kapcsolattal bíró butonok kialakítása (Geinisman és *mtsai*, 2001). Ezek előfordulása az agykéregben a teljes szinapszisok számát tekintve alacsony, változásuk ugyanakkor a plaszticitás, az információ divergencia növekedésének egyik fontos jele (Geinisman és *mtsai*, 2001). A többszörös kapcsolattal bíró butonok (36G,H ábra) száma 1 mm<sup>2</sup>-en jelentősen több volt a transzgenikus, mint a vad típusú állatokban (vad típusú:  $2,2 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $3,7 \times 10^3 \pm 0,28 \times 10^3$ ,  $*p < 0,05$ ). A diszektor sztereológiai módszert alkalmazva (Sterio, 1984) és 1 mm<sup>3</sup> számítva a kérdéses profilok numerikus denzitása a transzgenikus állatokban jelentősen magasabb volt (vad típusú:  $0,7 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $1,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ ,  $*p < 0,05$ ).





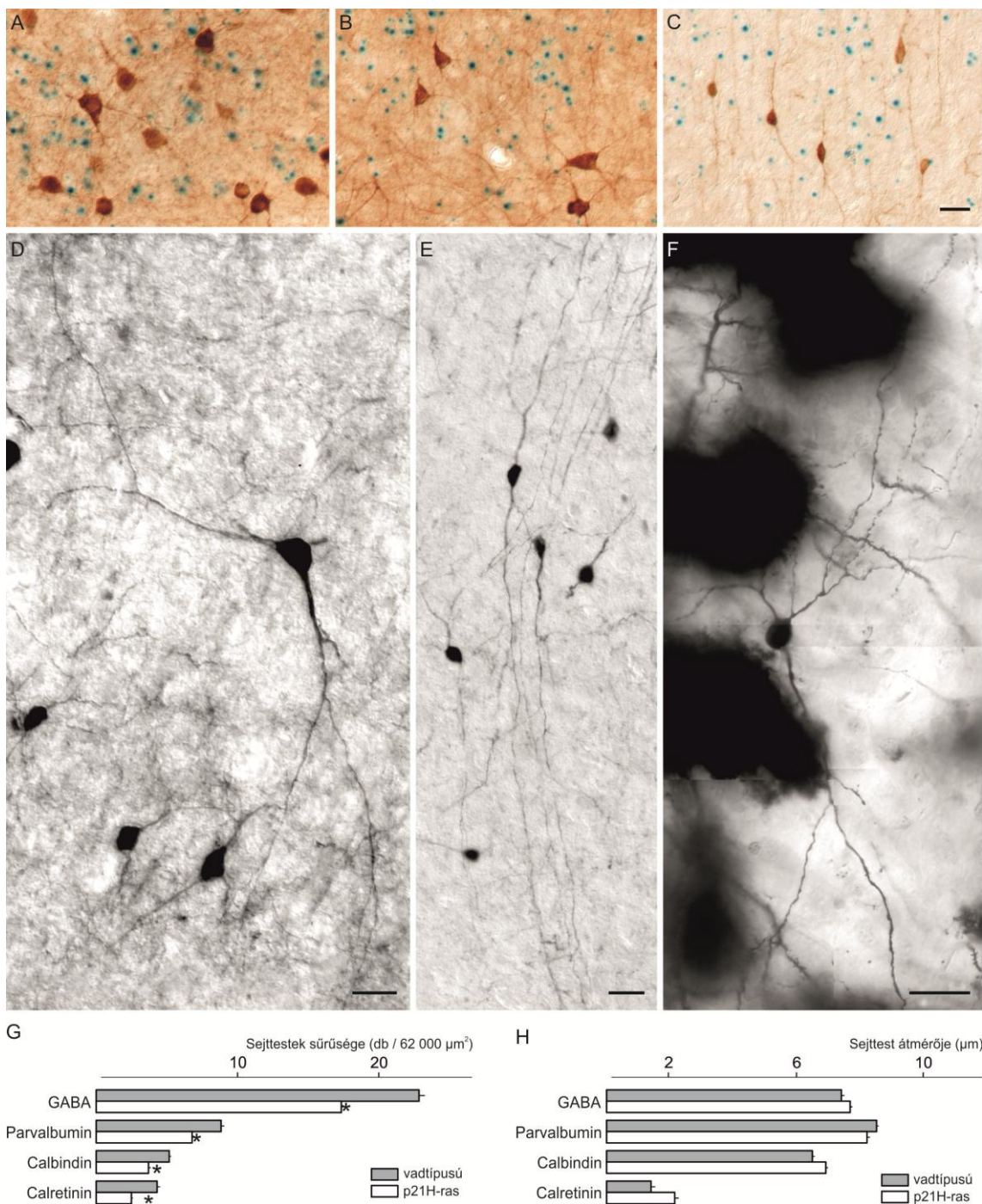
**36. ábra.** Talamikus tüskés neuronok (A,B) képe p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerek szomatoszenzoros kérgének IV. rétegében. A VGLUT2<sup>+</sup> terminálisok (nyílhegyek a C,D ábrán) sűrűsége a retrográd feltöltött piramissejtek dendritjein (C,D) és a többszörös szinapszisok sűrűsége (G,H) a transzgenikus állatokban megemelkedett, a varikozitások közötti távolság komisszurális axonokon csökkent (E,F). Lépték: 10  $\mu$ m (A-F), 500nm (G,H).



***Transzgént nem expresszáló interneuronok adaptív változásai***

A p21H-ras<sup>Val12</sup> egérvonal egyedeiben a piramissejtekkel ellentétben az interneuronok nem expresszálják a transzgént. Az interneuronok három fő csoportját (Celio, 1990; Freund és Buzsáki, 1996; Schwaller és *mtsai*, 1993) vizsgálva ugyanis sem a parvalbumin<sup>+</sup>, sem a calbindin<sup>+</sup>, sem a calretinin<sup>+</sup> sejtek nem voltak X-gal-festettek (37A-C ábra), utóbbi reakciót jellegzetesen a piramissejtek rétegében figyeltük meg kimagaslóan nagy sűrűséggel (27. ábra).

A GABA<sup>+</sup>, parvalbumin<sup>+</sup>, calbindin<sup>+</sup> és calretinin<sup>+</sup> sejtek morfológiáját vizsgálva kimutattuk, hogy sejtestük alakja, látható dendritjeik és axonjaik mintázata nem mutatott genotipikus különbségeket (37D-F ábra). Mind a p21H-ras<sup>Val12</sup>, mind a vad típusú populációban a Golgi impregnációval, calbindin- vagy calretinin immunfestéssel láthatóvá tett sejtek dendritjei – sejtípustól függően - a megvastagodott kéreg csaknem (II-V. rétegek) vagy teljes (I-VI) egészét átérték (37D-F ábra). A GABA<sup>+</sup>, parvalbumin<sup>+</sup>, calbindin<sup>+</sup> és calretinin<sup>+</sup> sejtestek átlagos átmérője nem mutatott különbséget a két genotípus között (37H ábra).



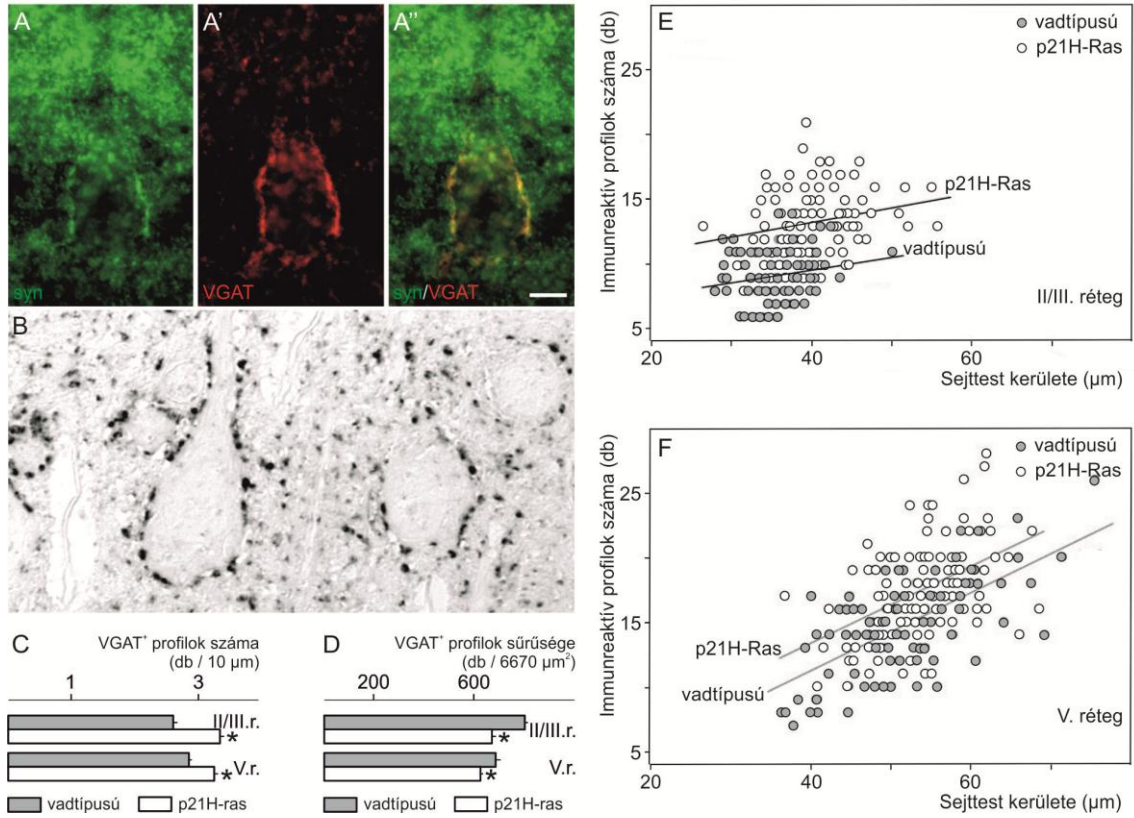
**37. ábra.** Parvalbumin<sup>+</sup> (A), calbindin<sup>+</sup> (B) és calretinin<sup>+</sup> (C) interneuronokban nem találtunk X-gal hisztokémiai reaktivitást. Calbinin<sup>+</sup> (D), calretinin<sup>+</sup> (E) és Golgi-impregnált (F) interneuron képe. A dendriték átérlik a kéreg egészét. Az interneuronok különböző populációinak sűrűsége a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerek szomatoszenzoros kérgében csökken (G), sejttestük mérete nem változik (H). Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (G,H). Lépték: 10  $\mu\text{m}$  (A-D), 20  $\mu\text{m}$  (E,F).

Mennyiségi vizsgálataink kimutatták, hogy a GABA<sup>+</sup> (vadtípusú:  $22,88 \pm 0,27$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $17,32 \pm 0,25$ , \* $p < 0,05$ ), parvalbumin<sup>+</sup> (vadtípusú:  $8,87 \pm 0,17$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $6,84 \pm 0,14$ , \* $p < 0,05$ ), calbindin<sup>+</sup> (vadtípusú:  $4,35 \pm 0,21$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:

3,77 ± 0,09, \* $p < 0,05$ ) sejttestek sűrűsége a transzgenikus populációban a kéreg növekedésének arányában – 23-27%-kal - csökkent a vad típusú populációban mértékhez képest (37G ábra). Ezzel szemben a calretinin<sup>+</sup> sejttestek sűrűsége (vad típusú: 4,35 ± 0,21 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 2,53 ± 0,09, \* $p < 0,05$ ) nagyobb arányban, 42%-kal csökkent. Elvértve figyeltünk csak meg parvalbumin<sup>+</sup> vagy calbindin<sup>+</sup> piramissejt alakú neuronokat, ezeket analízisünkben nem vettük figyelembe.

A gátló terminálisok mennyiségi analízisét VGAT-immunfestett metszeteken végeztük. Miután megmutattuk, hogy a VGAT<sup>+</sup> profilok szinaptofizinnel kolokalizálnak (38A-A'' ábra), félvékony metszeteken (38B ábra) meghatároztuk azok sűrűségét a megnagyobbodott piramissejtek testének kerülete mentén. A vad típusú állatokhoz képest a transzgenikus egerekben mind a II/III. rétegi (vad típusú: 35,39 ± 0,39 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 40,35 ± 0,52, \* $p < 0,05$ ), mind az V. rétegi (vad típusú: 51,22 ± 0,77 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 53,83 ± 0,59, \* $p < 0,05$ ) piramissejtek testének kerülete nagyobb volt. A sejttest kerülete mentén a profilok száma a transzgenikus állatokban úgy növekedett mind a II/III. rétegi (vad típusú: 9,16 ± 0,18 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 13,34 ± 0,25, \* $p < 0,05$ ), mind az V. rétegi (vad típusú: 14,64 ± 0,36 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 17,5 ± 0,37, \* $p < 0,05$ ) piramissejtek esetén, hogy azok periszomatikus sűrűsége (profil / 10 μm) a transzgenikus csoportban nagyobb lett a II/III. rétegi (vad típusú: 2,6 ± 0,1 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 3,3 ± 0,1, \* $p < 0,05$ ) és az V. rétegi (vad típusú: 2,6 ± 0,1 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 3,3 ± 0,1, \* $p < 0,05$ ) principális sejtek esetén is (38C,E,F ábra).

A piramissejtek periszomatikus régióján kívül a VGAT<sup>+</sup> profilok általános sűrűségét is meghatároztuk (38D ábra). Transzgenikus állatokban ez az érték a vad típusúhoz mérten csökkent, mind a II/III. rétegben (a 6670 μm<sup>2</sup> nagyságú méretkeretben számolva vad típusú: 796,1 ± 9,26 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 669 ± 7,56, \* $p < 0,05$ ), mind az V. rétegben (a 6670 μm<sup>2</sup> nagyságú méretkeretben számolva vad típusú: 683,96 ± 15,96 vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>: 623,96 ± 9,38, \* $p < 0,05$ ).



**38. ábra.** Szinaptifizin<sup>+</sup> profilok (A) VGAT-immunoreaktivitást (A') mutatnak piramis sejtek sejttestei körül (A''). A félvékony metszeteken azonosított VGAT<sup>+</sup> profilok (B) sűrűsége a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerek piramis sejttestei körül növekszik (C), míg általános sűrűségük csökken (D). Azonos kerületű piramis sejttestek esetén a VGAT<sup>+</sup> profilok száma transzgenikus állatokban mind a II/III. rétegben (E), mind az V. rétegben (F) magasabb. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (C,D). Lineáris regresszió \* $p < 0,05$ . (E,F). Rövidítések: **syn** szinaptifizin, **VGAT** vezikuláris GABA transzporter. Lépték: 5  $\mu$ m (A-A'').

### Hippokampuszban tett megfigyelések

#### A hippocampus mérete a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egértörzs egyedeiben nő

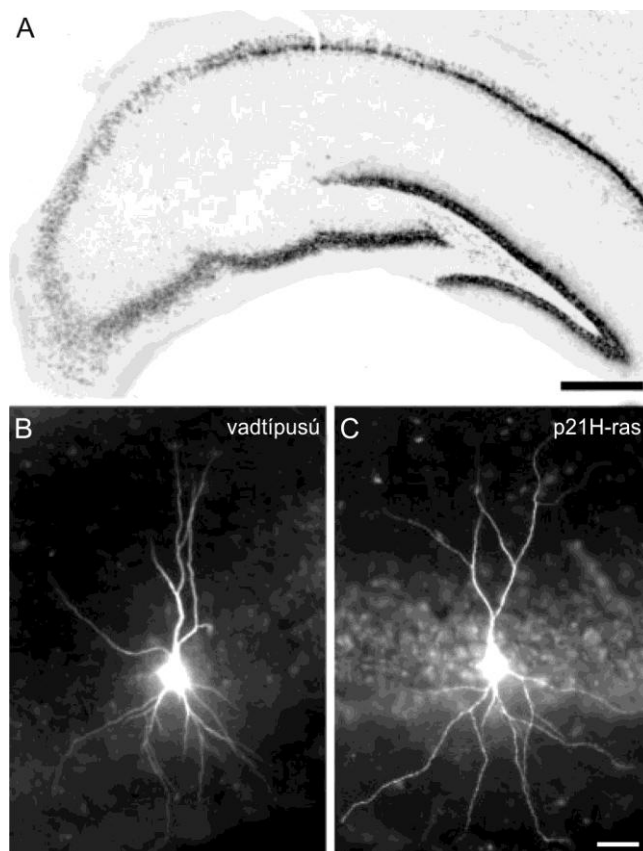
A hippocampus méretét két módon határoztuk meg. Első kísérletünkben a hippocampusból készült (nem perfundált és nem dehidrált) 110  $\mu$ m vastag szériametszetek felszínét megmértük, megszoroztuk a metszet vastagságával, majd a térfogati értékeket összegeztük. A hippocampus térfogata a transzgenikus állatokban 19%-kal nagyobb volt, mint a vad típusú csoportban (vadtípusú:  $15,3 \pm 1,1$  mm<sup>3</sup> vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $18,1 \pm 1,2$  mm<sup>3</sup>, \* $p < 0,05$ ). A Cavalieri-féle becsléssel 21%-os volumen növekedést állapítottunk meg (vadtípusú:  $15,5 \pm 2,1$  mm<sup>3</sup> vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $18,8 \pm 1,5$  mm<sup>3</sup>, \* $p < 0,05$ ).

A hippocampus méretének növekedése összefüggésben állt az idegsejtek méretének megváltozásával. A diszektor sztereológiai módszert alkalmazva

megállapítottuk, hogy a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek teste, valamint az ammonsarv CA2 és CA3 régiójának piramissejtjeinek teste a transzgenikus állatokban nagyobb lett (13. táblázat). A CA1 régió piramissejtjeinek teste nem mutatott genotípustól függő méretbeli változást (13. táblázat).

### ***A dendritfa morfológiai változásai***

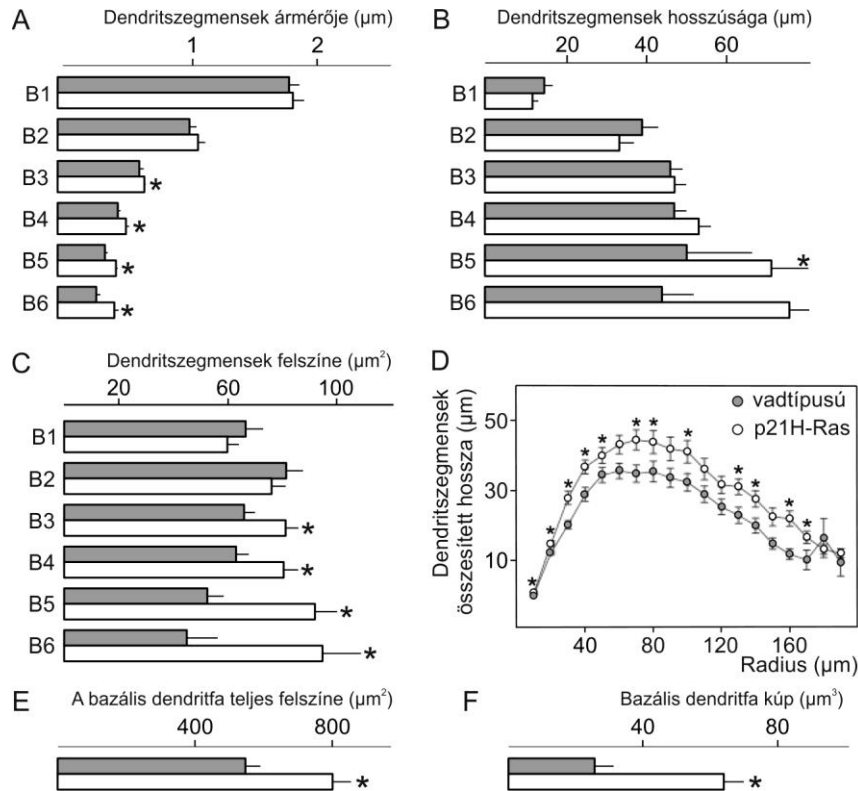
A fixált szeleten, Lucifer sárgával feltöltött CA1 régióbeli piramissejtek dendritfája jól detektálhatóan kirajzolódott (39. ábra). Az apikális dendritfa néha az általánostól eltérő formát mutatott; azokat a sejteket, melyek két apikális dendrittel bírtak, nem vizsgáltuk. Ábráinkon a bazális és apikális dendritfák szignifikánsan megváltozott mennyiségi jellemzőit jelenítettük meg.



**39. ábra.** Az X-gal festés p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egér hippocampuszában a piramissejtek és a szemcsesejtek rétegére korlátozódik (A). Fixált szeleten feltöltött CA1 piramissejtek képe vad típusú (B) és transzgenikus (C) állatban. *Lépték:* 500  $\mu$ m (A), 25  $\mu$ m (B,C).

*A bazális dendritfa változásai a növekedés jeleit mutatják*

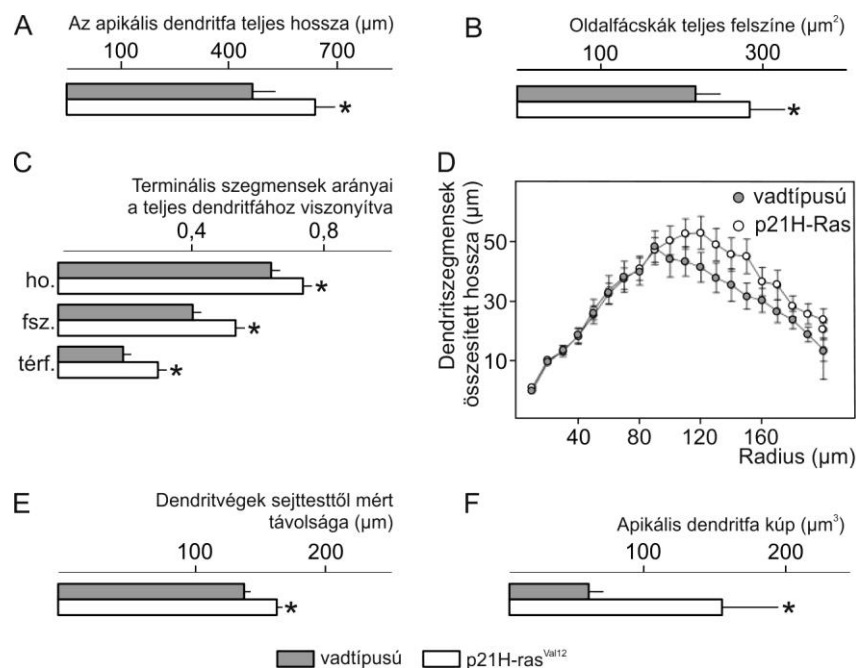
A bazális dendrit szegmensek száma és kanyargóssága a két genotípusban nem mutatott változást (14. táblázat). Transzgenikus egerekben az ötödik szegmensek hossza, az intermedier és disztális szegmensek átlagos átmérője megnövekedett, ami utóbbi szegmensekben következményes felszín- és térfogat növekedést eredményezett (40A-C ábra). Sholl analízissel kimutattuk, hogy a dendritikus denzitás sejttesttől mért távolságban mért mintázata genotípustól független, maximumát a 60-80 $\mu$ m távolságban éri el, de transzgenikus állatokban a vad típusúakhoz képest megemelkedett (40D ábra). A bazális dendritfa felszíne, az őt lefedő kúp felszíne (convex hull) (40E,F ábra), valamint a dendritvégek sejttesttől való távolsága (vad típusú:  $101,4 \pm 2,4$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $112,9 \pm 2,5$ ,  $*p < 0,05$ ) a transzgenikus populáció egyedeiben megnövekedett.



**40. ábra.** A CA1 régióbeli piramis sejtek bazális dendrit szegmens átmérőit a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben megnövekedtek (A), mely a többnyire változatlan hosszúság (B) mellett is jelentős felszín-növekedéshez (C) vezetett. A dendritikus denzitás a sejttesttől mért legtöbb távolságban nagyobb lett (D), a bazális dendritfát lefedő kúp (convex hull) felszíne (E) illetve térfogata (F) a transzgenikus állatokban megnövekedett. Átlag  $\pm$  standard hiba,  $*p < 0,05$  (A-F).

### Az apikális dendritfa csekély morfológiai változást mutat

Míg az egyes szegmensek szintjén nem találtunk genotípusos eltérést (14. táblázat), és a dendritikus denzitást jellemző Sholl analízisünk sem mutatott változást (41D ábra), az apikális dendritfa teljes hossza és az oldalfácskák felszíne a transzgenikus csoportban megnövekedett (41A,B ábra). A végszegmensek hossza, a teljes dendritfa felszíne és térfogata a p21H-ras<sup>Val12</sup> egértörzs egyedeiben magasabb értéket mutatott (41C ábra). Hasonlóan megnövekedett a dendritvégek sejttesttől mért átlagos távolsága (41E ábra), és a dendritfa térbeli kiterjedését jellemző, azt lefedő kúp felszínének nagysága is (41F ábra).



**41. ábra.** A CA1 régióbeli piramisisejtek apikális dendritfáinak teljes hossza (**A**), oldalfácskáinak hossza (**B**), valamint végszegmenseinek hossza, felszíne és térfogata (**C**) a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus állatokban megnövekedett, a dendritikus denzitás a sejttesttől mért különböző távolságokban ugyanakkor nem változott (**D**). A dendritvégek sejttesttől mért távolsága (**E**) és az apikális dendritfát körbevevő kúp térfogata (**F**) transzgenikus állatokban nagyobb lett. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (**A-F**).

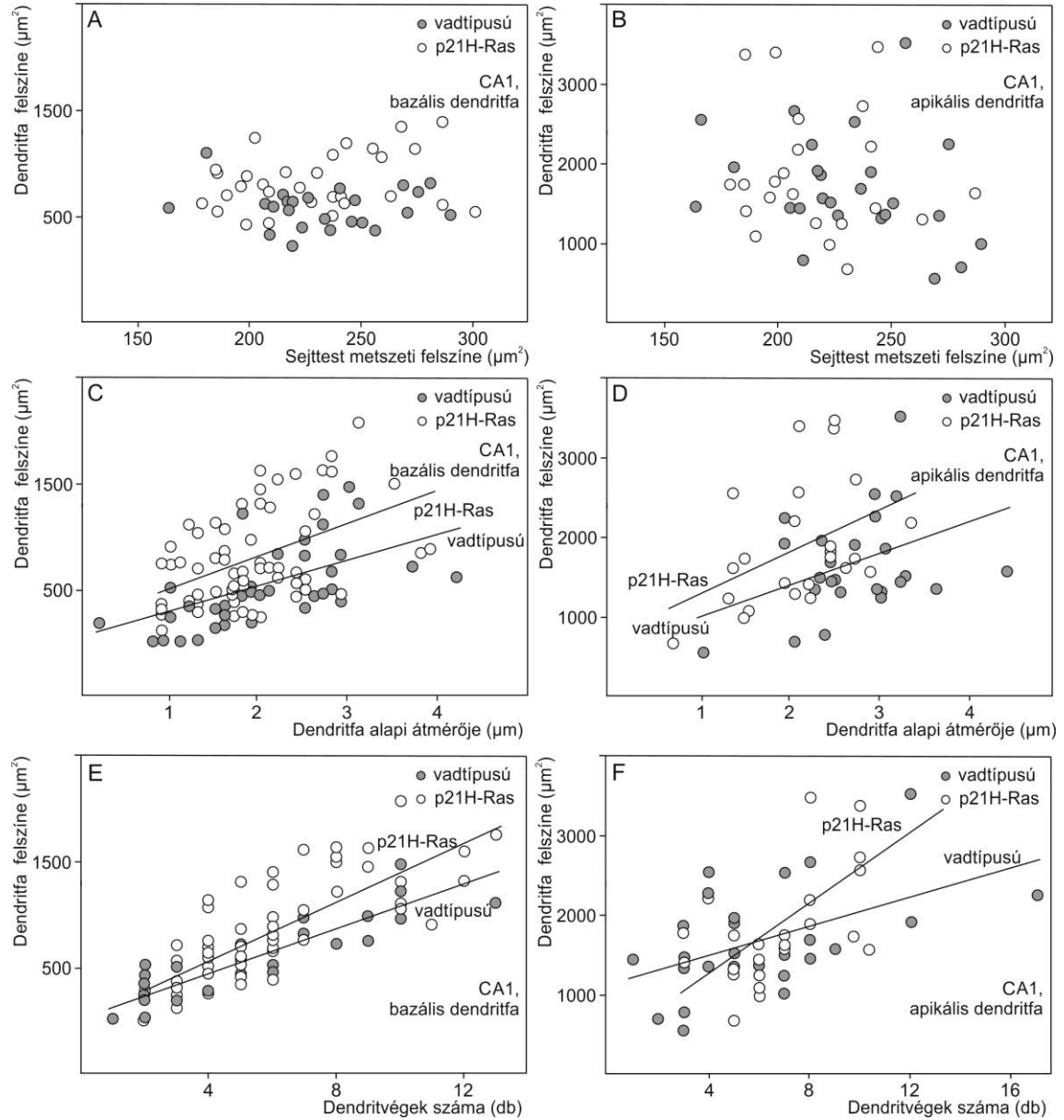
### A bazális és apikális dendritfák alapvető geometriai felépítése a p21H-ras<sup>Val12</sup> egértörzs CA1 piramisisejtjein nem változik

Ezekben az elemzésekben a dendritfa méretét a sejttest méretével, a dendrit alapi átmérőjével és a dendritvégek számával vetettük össze.

Mind a bazális, mind az apikális dendritfa felszíne függetlenül alakult a sejttest méretétől ( $p > 0,05$ ), és ezt a genotípus nem befolyásolta (42A,B ábra). A bazális és



apikális dendritfák felszíne ugyanakkor mindkét genotípusban pozitívan korrelált a dendritfa alapi átmérőjével, de egyező alapi átmérőjű dendrithez transzgenikus állatban nagyobb dendritfelszín tartozott (\* $p < 0,05$ ) (42C,D ábra). Hasonló pozitív korrelációt és genotípusbeli különbséget (növekedést) mutattunk ki a dendritfa felszíne és a dendritvégek száma között is (\* $p < 0,05$ ) (42E,F ábra).



**42. ábra.** A bazális és apikális dendritfák felszíne nem korrelál a sejtestest metszeti felszínével sem vadtípusú, sem p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerek CA1 piramissejtjeiben (A,B). A dendritfák alapi átmérői (C,D) és a dendritvégek számai (E,F) ugyanakkor korrelációt mutat a dendritfa felszínével, a transzgenikus állatokban konzekvensen magasabb értékekkel (C-F). Lineáris regresszió \* $p < 0,05$  (A-F).



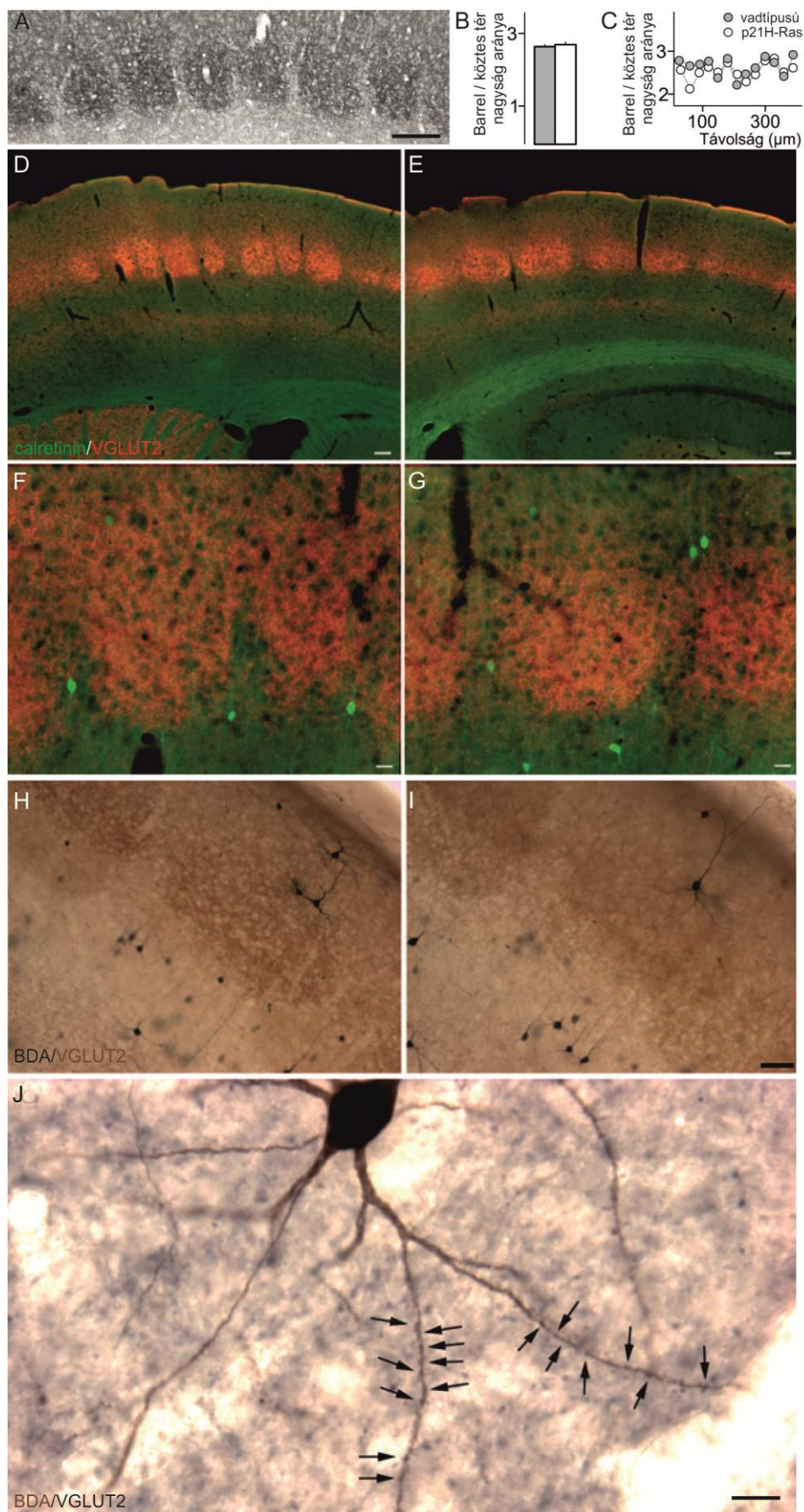
***Szinapszisszám változások a p21H-ras<sup>Val12</sup> egértörzs hippocampusában***

A dendritstruktúra megváltozása a szinapszisok számának megváltozásához vezethet (Katz és Shatz, 1996). A diszektor sztereológiai módszer segítségével meghatároztuk a CA1 régió stratum radiatumában a szinaptikus kapcsolatok numerikus denzitását. A két genotípusban mért érték csaknem azonos volt (vadtípusú:  $32,5 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $32,7 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^7$ ,  $p > 0,05$ ). A változatlan érték a megnagyobbodott hippocampusz tükrében ugyanakkor a szinapszisok abszolút számának növekedésére utal.

***A p21H-ras<sup>Val12</sup> fehérje hatása afferens deprivációban******A barrelek kiterjedése a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egértörzs egyedeiben nő***

A IV. és IIIb rétegben elhelyezkedő barrelek méretét a talamokortikális afferenseket jelölő VGLUT2-immunhisztokémiával tettük láthatóvá (43A ábra). Koronális metszeteken meghatározott kiterjedésük alapján megállapítottuk, hogy transzgenikus állatokban mind ezek (vadtípusú:  $25286,1 \pm 669,7$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $30748,0 \pm 693,7$ ,  $*p < 0,05$ ), mind a közöttük lévő „interbarrel” terület nagysága (vadtípusú:  $9981,2 \pm 269,6$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $11823,0 \pm 354,4$ ,  $*p < 0,05$ ) a vadtípusúakban mérthez képest jelentősen megnagyobbodott. A barrelek és a közöttük lévő terület nagyságának aránya ugyanakkor genotípustól függetlenül változatlan maradt (43B ábra), a barrelek kraniokaudális helyzetétől függetlenül (43C ábra).

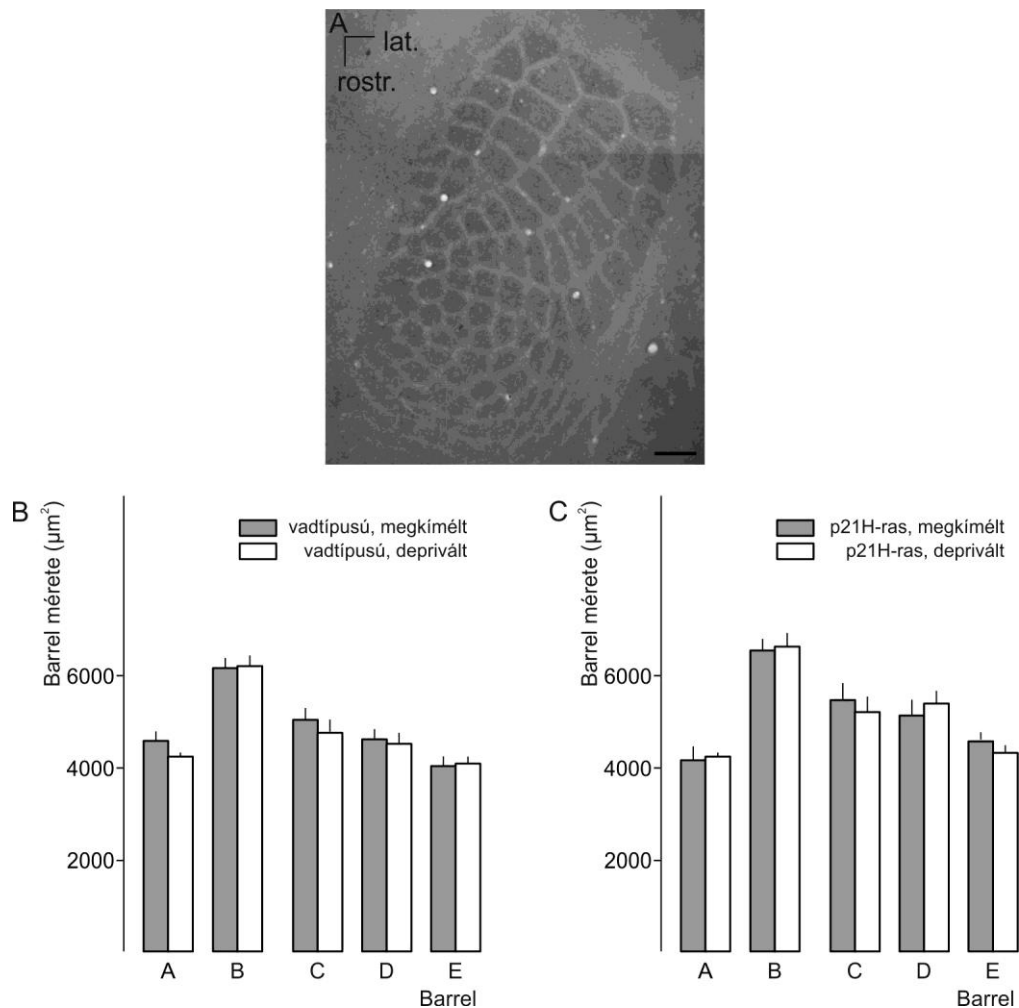
Az agykérgi calretinin<sup>+</sup> interneuronok egy csoportja, a double bouquet sejtek, jellegzetesen a barrelek szélén foglalnak helyet. Kettős immunhisztokémiai (VGLUT2/calretinin) festéssel kimutattuk, hogy ezeknek a sejteknek a helyzete a p21H-ras<sup>Val12</sup> egerekben nem változik, dendritjeik vertikálisan nyúlnak át a rétegeken (43D-G ábra).



**43. ábra.** A VGLUT2<sup>+</sup> barrelek (A) és a közöttük lévő terület nagyságának aránya a p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerek kérgében nem változott (B), függetlenül a kraniokaudális elhelyezkedéstől (C). A calretinin<sup>+</sup> double bouquet sejtek mind vadtípusú (D,F), mind a transzgenikus (E,G) állatokban a VGLUT2<sup>+</sup> barrelek szélén helyezkedtek el. A VGLUT2<sup>+</sup> barrelekben azonosított retrográd feltöltött piramissejtek (H,I) dendrit-felületén a VGLUT2<sup>+</sup> boutonok azonosíthatók (J). Átlag  $\pm$  standard hiba,  $p > 0,05$  (B,C). Lépték: 150  $\mu$ m (A), 25  $\mu$ m (D-J).

*A bajuszszőrök eltávolítása nem változtatja meg a barrelek méretét*

A bajuszszőröket az A, C és E sorokban megkíméltük, a B és D sorokban eltávolítottuk (kihúztuk), majd nyolc nap múlva a fixált agyvelő tangenciális metszetein meghatároztuk a hozzájuk tartozó barrelek méretét. Megállapítottuk, hogy a beavatkozás sem a vad típusú, sem a transzgenikus állatokban nem változtatta meg azok méretét, a megkímélt és deprivált barrelek mérete nem különbözött (44. ábra).

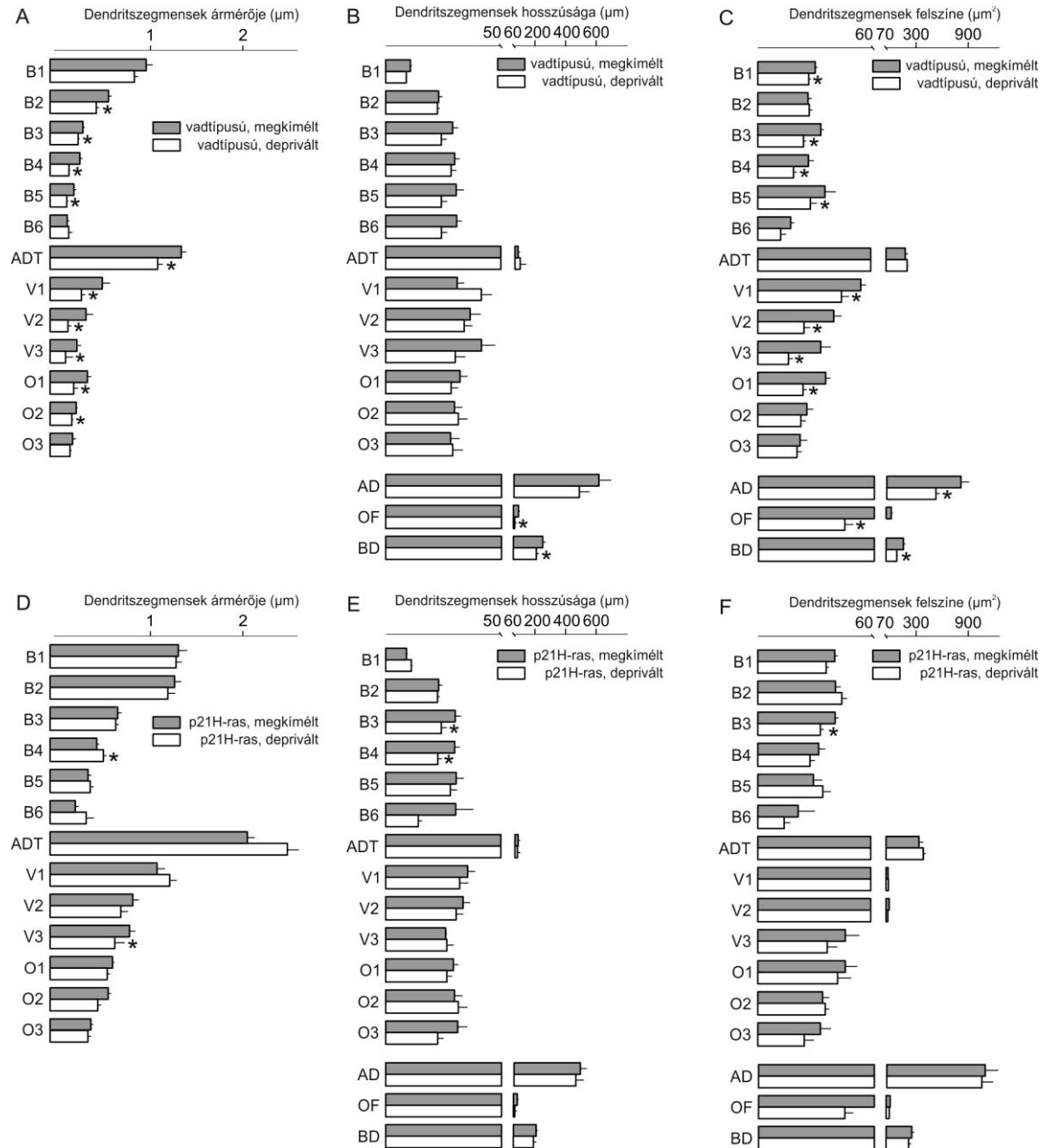


**44. ábra.** A tangenciális metszeten VGLUT2-immunhisztokémiával azonosított barrelek (A) mérete sem vad típusú (B) sem p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus (C) állatokban nem változott bajuszszőrirtás után. Átlag ± standard hiba,  $p > 0,05$  (B,C). Lépték: 200 μm (A).

*A p21H-ras<sup>Val12</sup> egértörzs egyedeiben a bajuszszőrök eltávolítása a vad típusúakhoz képest kisebb mértékű dendritsugorodást okoz*

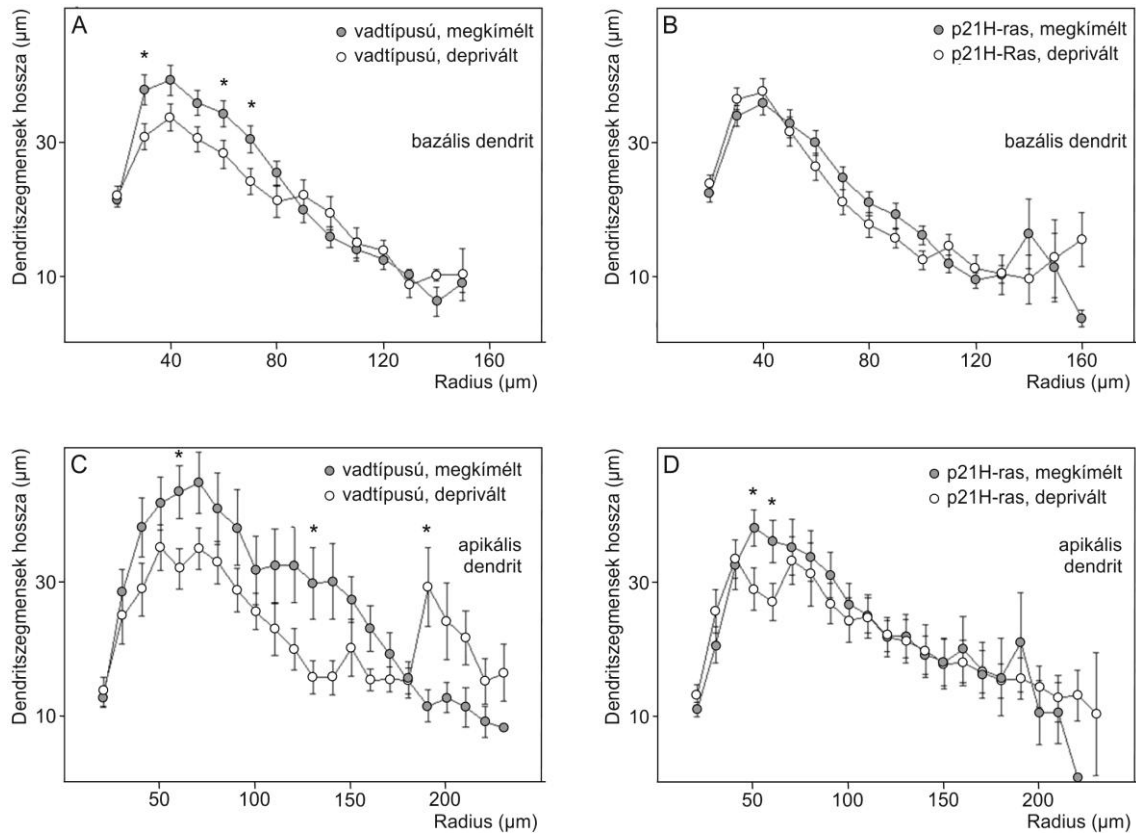
A megkímélt A barrelekben és a deprivált B barrelekben azonosított II/III. rétegi piramissejtek analízise lényeges genotípusbeli különbségekre világított rá (45. ábra).

Fő megállapításunk, hogy vadttípusú állatokban a bazális és apikális dendritfa csaknem valamennyi szegmensének átmérője kisebb lett a bajuszszőr eltávolítás után (45A ábra). Ez együtt járt mind az illető szegmensek, mind az egész dendritfa felszínének csökkenésével (45C ábra). A transzgenikus csoport egyedeiben csupán néhány szegmens átmérője csökkent (45D ábra), és ez nem befolyásolta a bazális és apikális dendritfák felszínét (45F ábra).



**45. ábra.** II/III. rétegi komissurális piramis sejtek mennyiségi jellemzői vadttípusú és p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egérben bajuszszőrirtás után. A vadttípusú állatokban megfigyelt szegmens átmérő csökkenés (A), összesített bazális dendrit és apikális oldalfácska hosszúság csökkenés (B), valamint következményes dendritfelszín csökkenés (C) a transzgenikus állatokban elmaradt (D-F). Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-F).

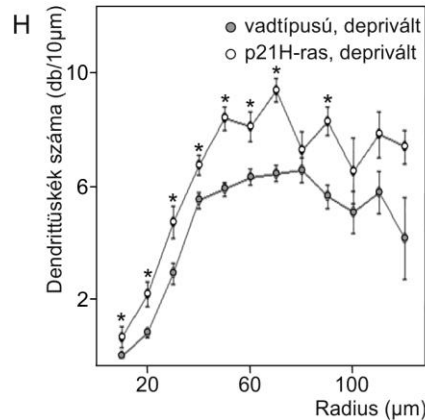
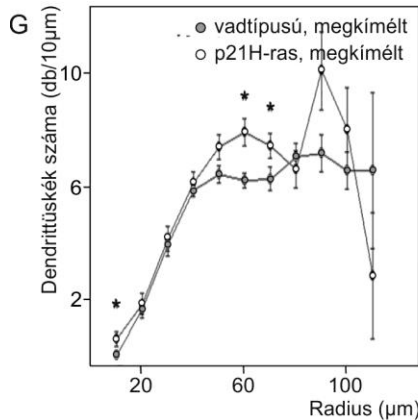
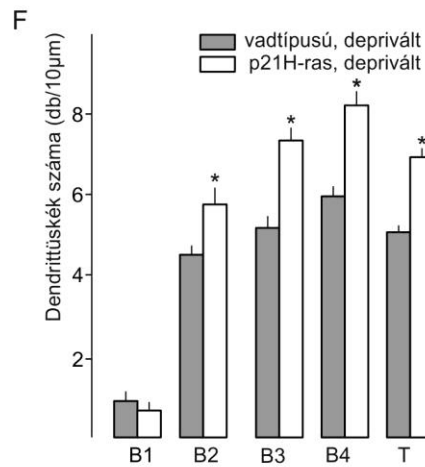
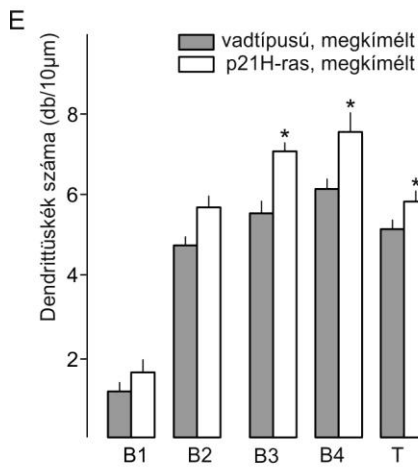
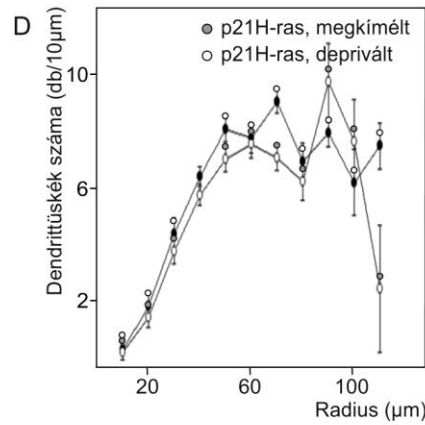
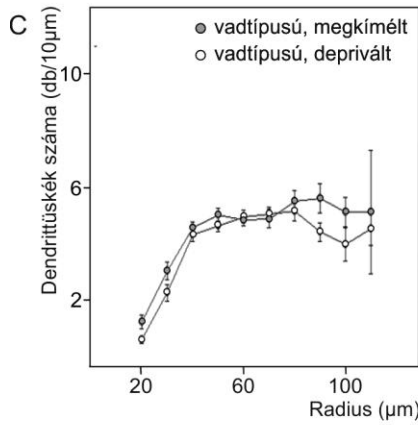
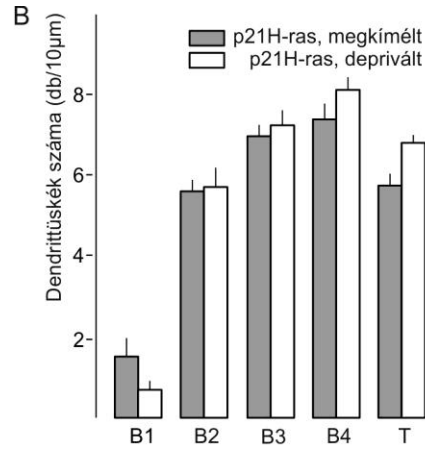
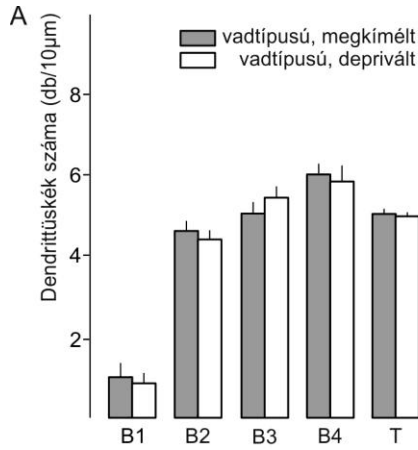
A dendritfa kiterjedését, arborizációjának változását több módszerrel is vizsgáltuk. Az afferens depriváció nem befolyásolta a dendrit elágazódási pontok összesített számát egyik genotípusban sem (15. táblázat). Hasonlóan alakult a dendritszegmensek összesített hossza a sejtesttől különböző távolságban lévő sávrádusokban is, bár a vad típusú csoport bazális és apikális dendritfáin is csökkenési tendenciát figyeltünk meg, és több rádiuszértéknél ez statisztikailag is szignifikáns volt (46. ábra). Ezt a depriváció utáni dendrit denzitás csökkenést a p21H-ras<sup>Val12</sup> egerekben csak kisebb mértékben detektáltuk (46B,D ábra). A vad típusú állatokban megfigyelt, depriváció utáni, különböző sávrádusokban megfigyelt csökkenési tendenciát alátámasztotta, hogy ebben a populációban a beavatkozás mind a bazális arborizáció, mind az apikális oldalfácskák összesített hosszának (45B ábra) és térbeli kiterjedésének (16. táblázat) csökkenéséhez vezetett. A bazális dendritfában a dendritvégek sejtesttől mért átlagos távolsága afferens depriváció után genotípustól függetlenül csökkent (17. táblázat). A statisztikailag jelentős, de arányában ugyanakkor nem nagymérvű dendrit hossz csökkenést jelzi, hogy az egyes dendrit szegmensek szintjén a beavatkozás nem okozott azok hosszában jelentős változást.



**46. ábra.** A bazális (A,B) és apikális (C,D) dendritfák denzitásának változásai bajuszszőritás után p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerekben. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-D).

*A p21H-ras<sup>Val12</sup> egerekben fellépő dendrittüske sűrűség a bajuszszőrök eltávolítása után is változatlan marad*

A bajuszszőrök eltávolítása után nem találtunk különbséget a megkímélt és deprivált barrek piramissejtjeinek különböző dendrit szegmensein a dendrittüske sűrűségben egyik genotípusban sem, és az nem függött a sejttesttől mért távolságtól sem (47A-D ábra). Megállapítottuk ugyanakkor, hogy a transzgenikus populációban mért dendrittüske sűrűség értékek mind a deprivált, mind a megkímélt barrekben magasabbak voltak a vad típusúakban mértéknél, ez a különbség független volt a sejttesttől való távolságtól, és a deprivált barrekben kifejezettebb volt (47E-H ábra).



**47. ábra.** A bajuszszőrítást nem változtatta meg a piramis-sejtek bazális dendritjeinek dendrittüske sűrűségét sem vadtípusú (A,C), sem p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus (B,D) állatokban. Transzgenikus állatokban a tüske-sűrűség mind a megkímélt (E,G), mind a deprivált (F,H) neuronok dendritjein magasabb volt. Szegmens (A,B,E,F) és Sholl (C,D,G,H) analízisek. Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-H). Rövidítések: B1-4, bazális szeg-mensek, T teljes érték.

*A bajuszszőrök eltávolítása genotípustól függetlenül csökkenti a talamikus butonok sűrűségét a piramissejtek bazális dendritjein*

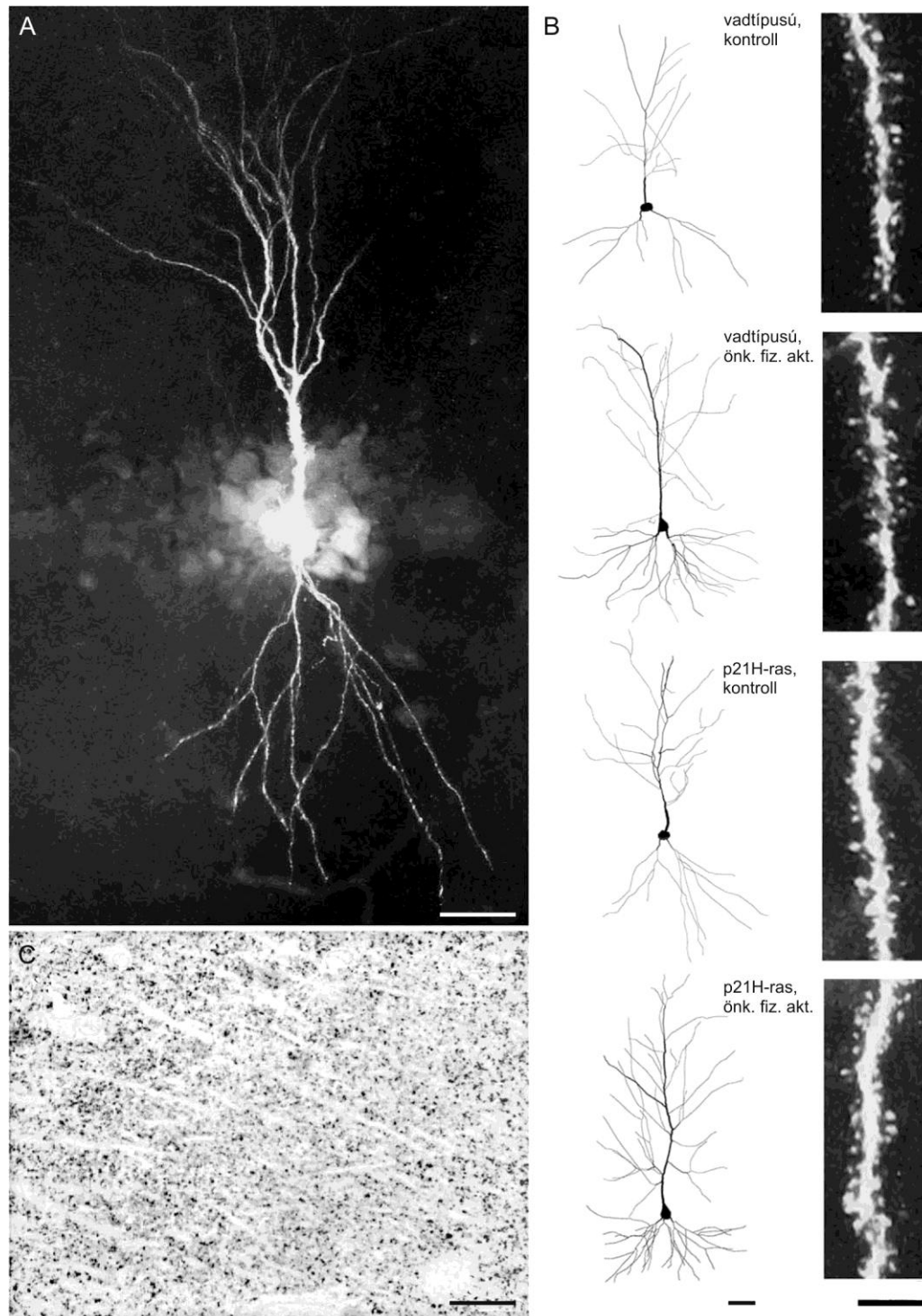
A VGLUT2<sup>+</sup> terminálisok sűrűsége az *in vivo* retrográd feltöltött III. rétegi piramissejtek bazális dendrit szakaszain a transzgenikus állatokban magasabb értéket mutatott mind a megkímélt (vadtípusú:  $2,61 \pm 0,12$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $3,31 \pm 0,1$ ,  $*p < 0,05$ , tüskék száma 10 $\mu$ m hosszú dendritszakaszon), mind a deprivált (vadtípusú:  $2,21 \pm 0,08$  vs. p21H-ras<sup>Val12</sup>:  $2,66 \pm 0,07$ ,  $*p < 0,05$ ) barrelekben. Ez annyit is jelentett, hogy a depriváció csökkentette a dendrittüske denzitást mind a vadtípusú (megkímélt:  $2,61 \pm 0,12$  vs. deprivált:  $2,21 \pm 0,08$ ,  $*p < 0,05$ ), mind a transzgenikus populációban (megkímélt:  $3,31 \pm 0,1$  vs. deprivált:  $2,66 \pm 0,07$ ,  $*p < 0,05$ ).

### ***A p21H-ras<sup>Val12</sup> expresszió hatása önkéntes fizikai aktivitásban***

*A p21H-ras<sup>Val12</sup> protein neuronális expressziója tovább fokozza az önkéntes fizikai aktivitás kiváltotta dendritikus növekedést*

A fixált szeleten feltöltött sejtek (48A ábra) analízise kimutatta, hogy önkéntes fizikai aktivitás hatására a CA1 régió principális sejtjeinek dendritfája méretében változik. Vadtípusú állatokban több bazális szegmens, és az apikális dendritfa néhány szegmense megvastagodott, a sejttesttől 50-100  $\mu$ m távolságban a bazális dendritszakaszok összesített hossza növekedett (49A,C ábra). Transzgenikus állatokban a fizikai aktivitás a dendritnövekedés jelei kifejezettebbek voltak: csaknem valamennyi bazális szegmens átmérője a vadtípusúban talált növekedésnek többszörösével emelkedett, az apikális dendritfa törzse és csúcsi szegmensek szintén megvastagodtak (49B,D ábra). Ezzel egyidejűleg az apikális dendritfa szakaszainak összesített hossza a sejttesttől 100-180 $\mu$ m távolságban jelentősen megnőtt, míg a bazális dendritfán csak kisebb mérvű növekedést találtunk annak proximális (sejttesthez közeli) régiójában (49C-F ábra).



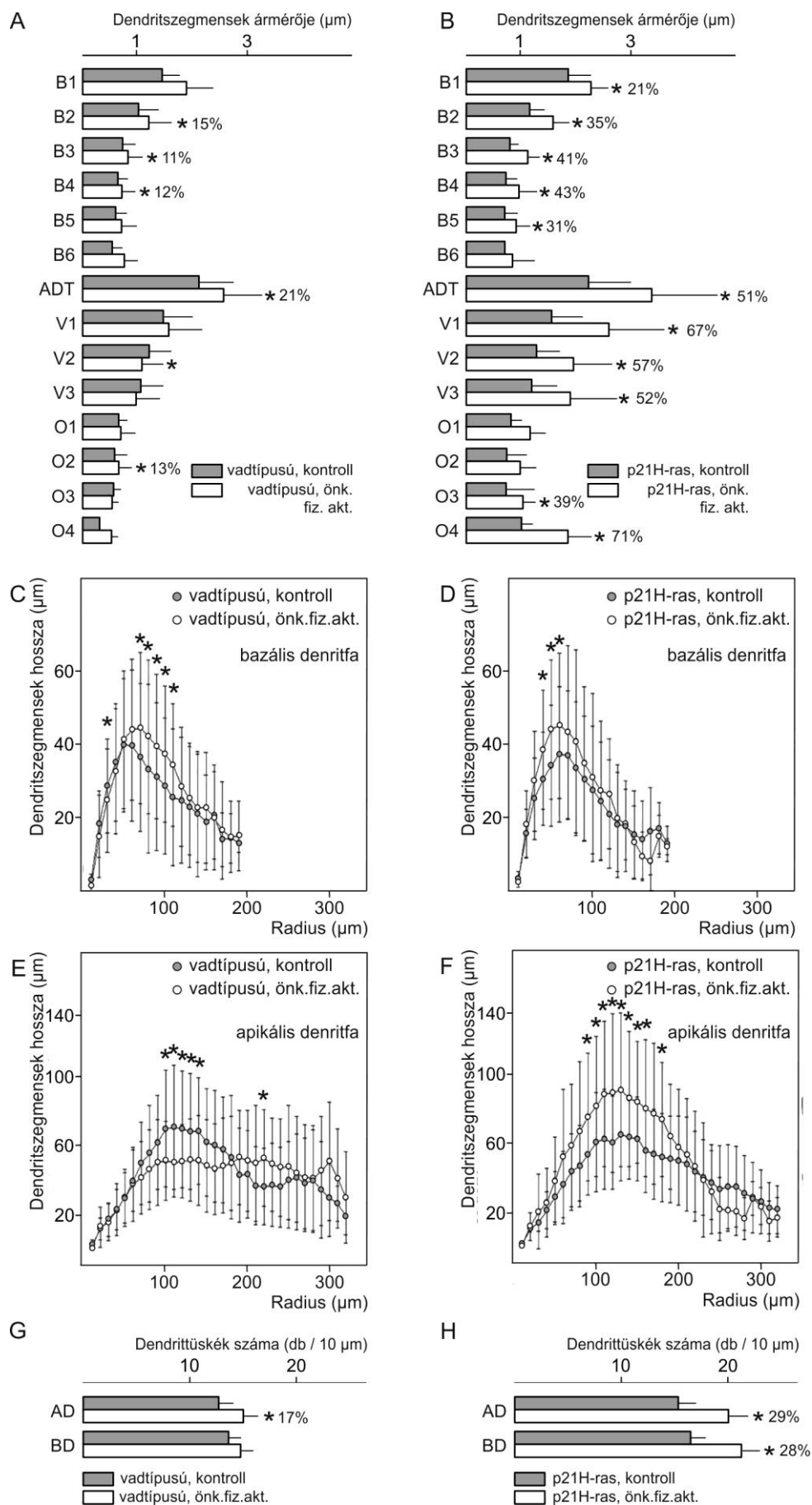


**48. ábra.** Fixált szeleten feltöltött CA1 piramissejt felvétele (A) és leképezése vad típusú és p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus állatokon, kontroll csoportban és önkéntes fizikai aktivitás után (B). A nagy nagyítású felvételeken a dendrittűskék látszanak (B, jobb oszlop). Szinaptofizin-immunoreaktivitás hippocampusz félvékony metszetén, a CA1 régió stratum radiatumában (C). Lépték: 20  $\mu$ m (A, B leképezett ábrák, C), 5  $\mu$ m (B nagy nagyítású felvételek).

*Az önkéntes fizikai aktivitás nagyobb mértékben növeli a dendrittüske sűrűséget a p21H-ras<sup>Val12</sup> egértörzs egyedeinek CA1 principális sejtjének dendritszakaszain, és ez valószínűsíthetően emelkedett számú szinaptofizin<sup>+</sup> profillal párosul*

Vadtípusú állatokban a fizikai aktivitás a vizsgált hippocampális piramissejtek apikális dendritjén növelte az egységnyi dendrithosszra eső dendrittüskék (48B ábra) sűrűségét (kontroll:  $12,71 \pm 2,01$  vs. kísérleti csoport:  $14,86 \pm 2,01$ ,  $*p < 0,05$ , tüskék száma  $10\mu\text{m}$  hosszú dendritszakaszon), míg a bazális dendriteken nem okozott változást (kontroll:  $13,73 \pm 2,41$  vs. kísérleti csoport:  $14,75 \pm 2,34$ ,  $p > 0,05$ ). A transzgenikus csoportban mind az apikális (kontroll:  $13,14 \pm 1,85$  vs. kísérleti csoport:  $17,01 \pm 1,88$ ,  $*p < 0,05$ ), mind a bazális dendrit szakaszokon növekedést mértünk (kontroll:  $14,09 \pm 1,71$  vs. kísérleti csoport:  $18,08 \pm 2,35$ ,  $*p < 0,05$ ) önkéntes fizikai aktivitás után. A növekedés mértéke a transzgenikus állatokban a vadtypusúban mértéknek csaknem kétszerese volt (49G,H ábra).

Félvékony metszeteinken (48C ábra) megállapítottuk, hogy a transzgenikus csoport CA1 régió stratum radiatumában a szinaptofizin<sup>+</sup> profilok száma önkéntes fizikai aktivitás után valószínűsíthetően megemelkedett (kontroll:  $894,72 \pm 29,56$  vs. kísérleti csoport:  $958,47 \pm 38,43$ ,  $p = 0,055$ ). A vadtypusú állatokban hasonló változásokat nem találtunk (kontroll:  $720,01 \pm 21,67$  vs. kísérleti csoport:  $727,96 \pm 29,43$ ,  $p = 0,755$ ).



**49. ábra (az előző oldalon).** Hippokampális CA1 piramissejtek mennyiségi jellemzői önkéntes fizikai aktivitás után p21H-ras<sup>Val12</sup> transzgenikus egerekben. A dendritszegmensek átmérője transzgenikus egerekben nagyobb mértékben és több szegmensben emelkedik (**A,B**). Sholl analíziseink (**C-F**) kimutatták, hogy a vad típusú állatokon megfigyelt dendritdenzitás növekedés (**C,E**) transzgenikus állatok neuronjainak apikális dendritjén tovább fokozódik (**F**). Az önkéntes fizikai aktivitás vad típusú állatokban növeli a dendrittüske sűrűséget az apikális dendriteken (**G**), transzgenikus állatokban ez a növekedés nagyobb mérvű, és a bazális dendritfára is kiterjed (**G,H**). Átlag  $\pm$  standard hiba,  $*p < 0,05$  (**A-H**). *Rövidítések:* ADT apikális dendrit törzs, **B1-6**, bazális szegmensek, **O1-4** oldalfácscsa szegmensek, **V1-3** végfácscsa szegmensek.

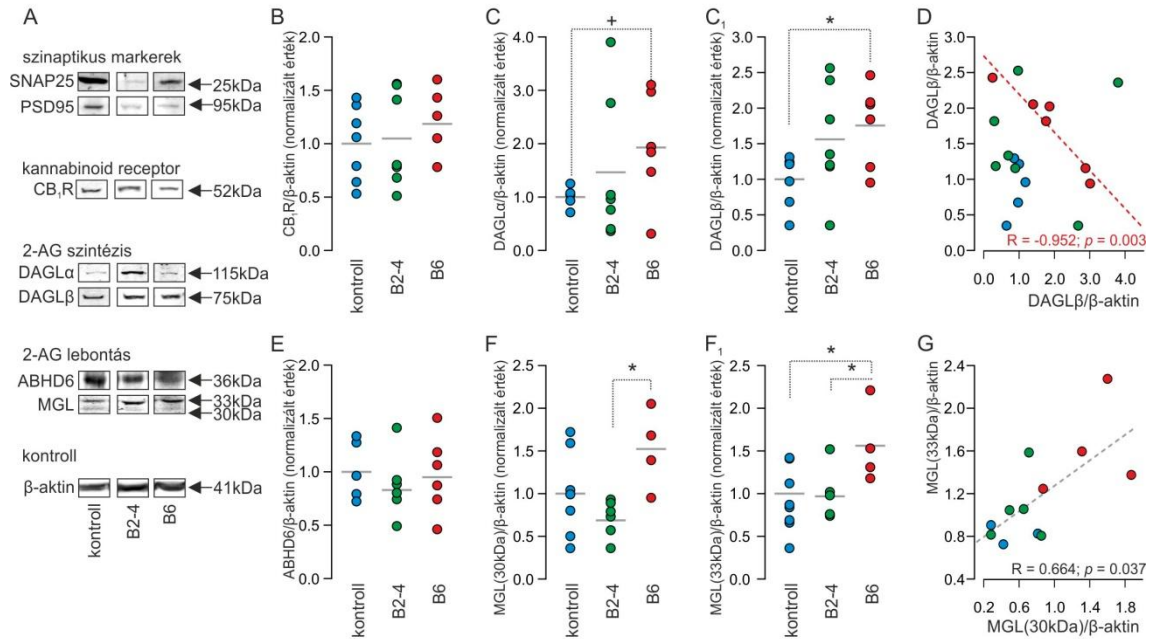
#### 4.4. Az endokannabinoid rendszer változásai Alzheimer-kórban

Munkánkban a 2-arachidonoil-glicerolhez kapcsolódó szignálrendszer változásait követtük nyomon Alzheimer-kórban, melyet kiegészítettünk az anandamid metabolikus enzimeinek és TRPV<sub>1</sub> receptorának változásaival. A következőkben azon változások bemutatására szorítkozom, melyek saját kísérletes eredményeimen nyugszanak. (A teljes közlemény ezen kívül farmakológiai, további biokémiai és ideglettani vizsgálatokat is tartalmaz).

##### ***A 2-arachidonoil-glicerolhez kapcsolódó szignálrendszer változásai***

##### *Western analízissel tett megfigyelések*

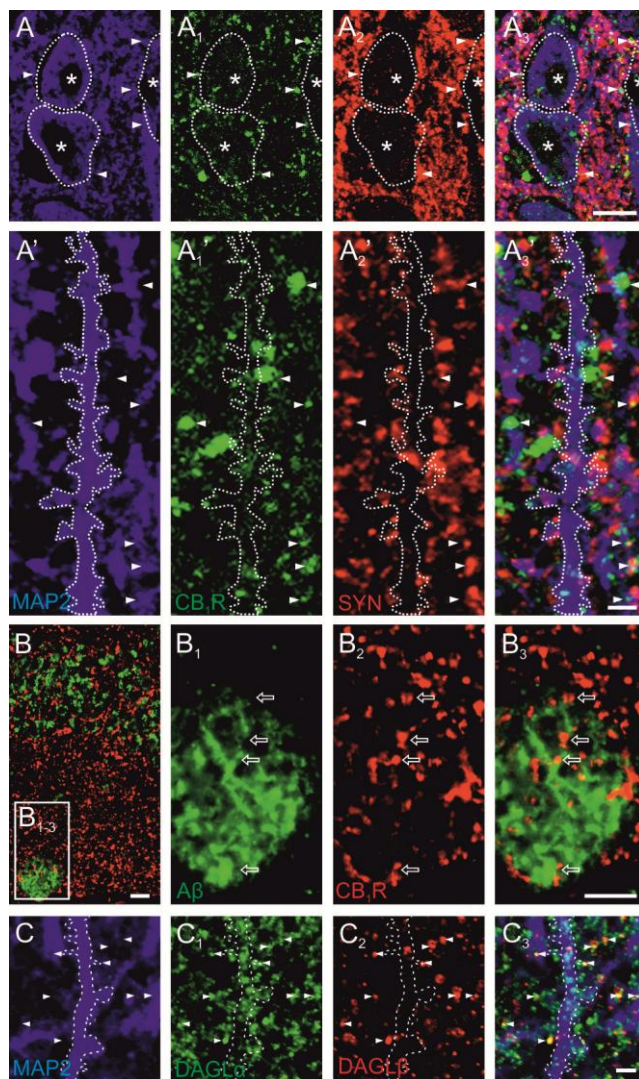
A neurodegeneratív betegségek jellemző velejárója a szinaptikus kapcsolatok számának csökkenése. Neurodegeneratív betegségben nem szenvedő idős emberek (kontroll csoport), korai/intermedier- valamint súlyos Alzheimer-kórban elhunytak hippocampális mintáit vizsgálva kimutattuk, hogy a preszinaptikus SNAP25 (Von Kriegstein és *mtsai*, 1999) és a posztzinaptikus PSD-95 fehérje expressziós szintje a vizsgált neurodegeneratív betegségben csökken (50A ábra). Míg a homogenizált mintákban a CB<sub>1</sub> receptor szintje változatlan maradt, előrehaladott betegségben a 2-arachidonoil-glicerol szintéziséért ( $\alpha$  és  $\beta$ -diacylglicerol-lipáz) és lebontásáért (monoacylglicerol-lipáz) felelős enzimek szintje megemelkedett; az ABHD6 expresszió ugyanakkor változatlan maradt (50B-F<sub>1</sub> ábra).



**50. ábra.** Pre- és posztzinaptikus markerek, valamint a 2-arachidonil-glicerol metabolizmusában szerepet játszó enzimek Western analízise (A). A CB<sub>1</sub> receptor (B) és az ABHD6 enzim (E) szintje az Alzheimer-kór előrehaladtával nem változik, az α és β-diacilglicerol-lipáz (C, C<sub>1</sub>) valamint a monoacilglicerol-lipáz (F, F<sub>1</sub>) expressziója ugyanakkor növekszik. Az α és β-diacilglicerol-lipáz szintjeinek kontroll esetben meglévő korrelációja Braak2-4 stádiumokban elvész, Braak6 stádiumban negatív korrelációba fordul (D). A monoacilglicerol-lipáz izoformáinak korrelációja a betegség progressziója során változatlan marad (G). Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (A-C<sub>1</sub>, E-F<sub>1</sub>). Lineáris regresszió \* $p < 0,05$  (D, G).

### Immunhisztokémiai megfigyelések

CB<sub>1</sub> receptorokat nagy számban találtunk a CA1-3 régiók stratum pyramidale és radiatum, valamint a gyrus dentatus stratum moleculare rétegében. A CB<sub>1</sub> receptor<sup>+</sup> profilok gyakran kolokalizáltak szinaptofizinnel, egy preszinaptikus markerrel, mind periszomatikusan (51A-A<sub>3</sub> ábra), mind a disztális dendritek mentén (51A'-A<sub>3</sub>' ábra). A CB<sub>1</sub> receptorok preszinaptikus elhelyezkedését tovább bizonyította, hogy CB<sub>1</sub> receptor<sup>+</sup> profilok a dendrit mikrotubulusokat jelölő (Binder és *mtsai*, 1986) MAP2 markerrel nem kolokalizáltak (51A-A<sub>3</sub>' ábra). A vizsgált receptor eloszlása Alzheimer-kórban elhunytak mintáiban sem változott. Gyakran megfigyeltük, hogy azok Aβ plakkok körül illetve azokban is előfordulnak (51B-B<sub>3</sub>' ábra), azokat a degenerációs folyamatok láthatóan nem érintették.

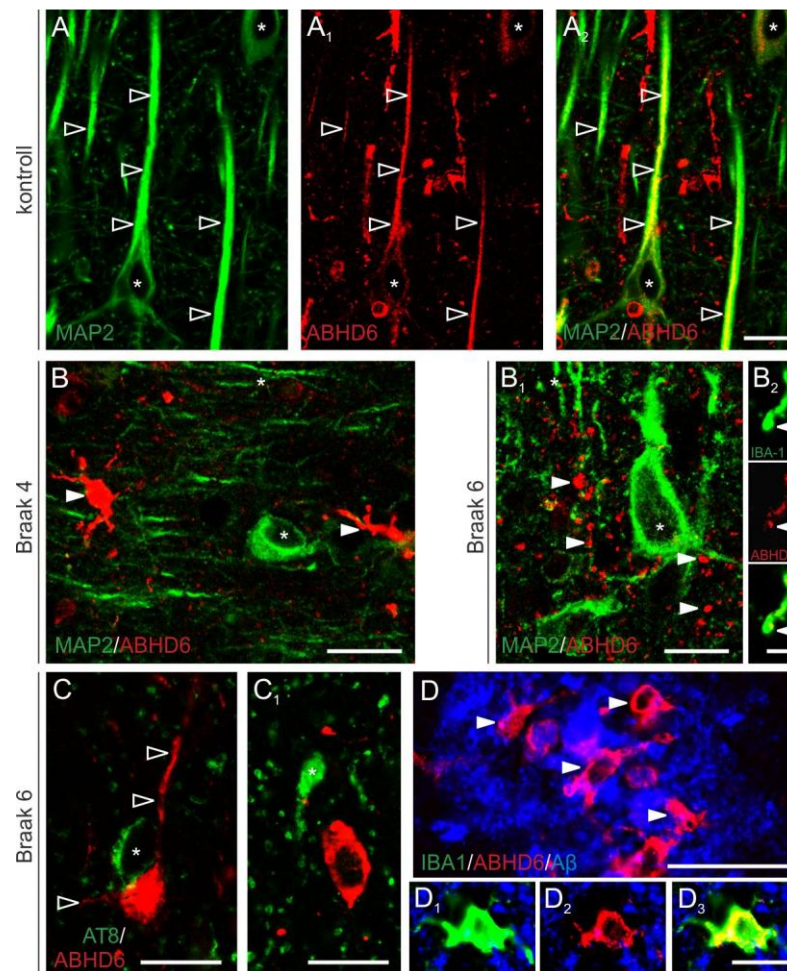


**51. ábra.** A szinaptofizinnel kolokalizáló CB<sub>1</sub> receptor<sup>+</sup> profilok piramisisejtek MAP2<sup>+</sup> sejttestei körül (**A-A<sub>3</sub>**, a csillagok a sejttestetek helyét jelzik, a nyílhegyek a CB<sub>1</sub> receptor<sup>+</sup>/MAP2<sup>+</sup> profilokra mutatnak) és apikális dendritjei mentén (**A'-A<sub>3</sub>'**, nyílhegyek) helyezkednek el. CB<sub>1</sub> receptor<sup>+</sup> végződéseket nagy számban találtunk Aβ<sup>+</sup> plakkok körül és plakkban (**B-B<sub>3</sub>**, nyílhegyek). Az α és β-diacilglicerol-lipáz<sup>+</sup> profilok a MAP2<sup>+</sup> posztzinaptikus kompartmentekben helyezkedtek el (**C-C<sub>3</sub>**, nyílhegyek). Lépték: 20 μm (**B-B<sub>3</sub>**), 12 μm (**A-A<sub>3</sub>**), 4 μm (**A'-A<sub>3</sub>'**, **C-C<sub>3</sub>**).

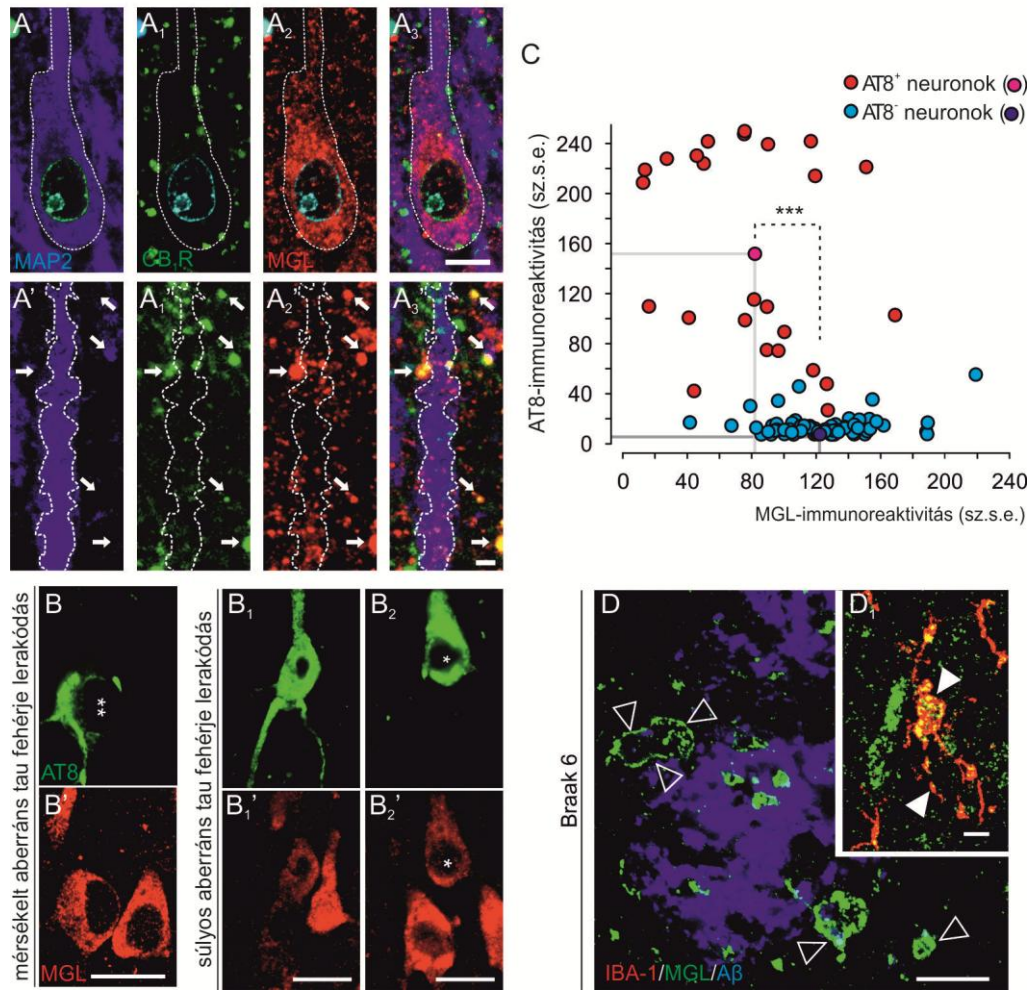
A 2-arachidonoil-glicerol metabolizmusáért felelős enzimek közül a lebontó enzimekkel kapcsolatban tettem saját megfigyeléseket. Míg a szintézisért felelős α és β-diacilglicerol-lipáz enzimeket MAP2<sup>+</sup> (51C-C<sub>3</sub> ábra), így vélhetően posztzinaptikus dendritikus struktúrákban találtuk, a lebontó enzimek mind pre- mind posztzinaptikusan előfordultak. Az ABHD6 enzimet először mikrogliaiban, majd hamarosan idegsejtek szomatodendritikus kompartmentjében is azonosították (Marrs és *mtsai*, 2010). Jóllehet Western analízissel Alzheimer-kórban változatlan ABHD6 fehérje szintet állapítottunk meg, immunhisztokémiai vizsgálataink rávilágítottak, hogy ezen jelenség mögött a neuronális és mikroglialis expresszió ellentétes irányú



változásai húzódnak (52. ábra). Míg kontroll mintánkban a principális sejtek élénk ABHD6-immunoreaktivitást mutattak, a betegség előrehaladott stádiumaiban a piramisisejtek szomatikus és dendritikus ABHD6-immunoreaktivitása csökkent (52A-B<sub>1</sub> ábra). A kóros neurofibrillumokat tartalmazó AT8<sup>+</sup> neuronokban ABHD6 expressziót nem azonosítottunk (52C, C<sub>1</sub> ábra). Ezzel párhuzamosan erős ABHD6-immunoreaktivitást figyeltünk meg kisméretű sejtekben, melyeket alakjuk és ionizált kalcium adapter fehérje (IBA-1) tartalmuk alapján mikrogliasejtként azonosítottunk (52B, B<sub>2</sub> ábra). A mikrogliasejtek különösen A $\beta$  plakkokban illetve azok körül jelentek meg nagy számban (52D-D<sub>2</sub> ábra).



**52. ábra.** ABHD6-immunoreaktivitás hippocampális piramisisejtek MAP2<sup>+</sup> apikális dendritjeiben (**A-A<sub>2</sub>**, *nyílhegyek*) neurodegeneratív betegség jelét nem mutató elhunytakban. Alzheimer-kórban a MAP2<sup>+</sup> struktúrák ABHD6-immunopozitivitásukat elvesztik, nagy számban figyeltünk meg ugyanakkor ABHD6<sup>+</sup> mikrogliasejteket (**B- B<sub>1</sub>**, *nyílhegyek*), melyek IBA-1-immunoreaktivitást mutattak (**B<sub>2</sub>**, *nyílhegyek*). Komplementer AT8- és ABHD6-immunoreaktivitás Braak6 stádiumú mintában (**B- B<sub>1</sub>**, a *nyílhegyek* az ABHD6<sup>+</sup> nyúlványokra mutatnak). ABHD6<sup>+</sup>/IBA-1<sup>+</sup> mikrogliasejtek A $\beta$ <sup>+</sup> plakkokban (**D-D<sub>3</sub>**, *nyílhegyek*). Lépték: 12  $\mu$ m (**A-D<sub>3</sub>**).



**53. ábra.** Monoacilglicerol-lipáz-immunoreaktivitás MAP2<sup>+</sup> piramisisejtek sejttestében (A-A<sub>3</sub>) és apikális denditje mentén, ahol a profilok CB<sub>1</sub> receptor-ko-immunoreaktivitást mutatnak (A'-A<sub>3</sub>'). A piramisisejtek sejttestében detektált monoacilglicerol-lipáz-immunoreaktivitás a halmozódó AT8-immunoreaktivitás ellenére – bár alacsonyabb szinten – megmarad (B-B<sub>2</sub>'). Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (C). Lépték: 10  $\mu$ m (B-B<sub>2</sub>), 8  $\mu$ m (D,D<sub>1</sub>), 6  $\mu$ m (A-A<sub>3</sub>,A'-A<sub>3</sub>').

A 2-arachidonoil-glicerol másik lebontó enzime, a monoacilglicerol-lipáz mind az idegsejtek sejttestében (53A-A<sub>3</sub> ábra), mind preszinaptikusan detektálható volt (53A'-A<sub>3</sub>' ábra). Monoacilglicerol-lipáz-immunoreaktivitást a CA1 piramisisejtek sejttestében, gyengébben az apikális dendritjének proximális részében találtunk, a dendritfa azonban jellemzően immunonegatív maradt (53A-A<sub>3</sub>' ábra). Nagy számban találtunk ugyanakkor CB<sub>1</sub> receptor<sup>+</sup>/monoacilglicerol-lipáz<sup>+</sup> profilokat, melyek idős emberek hippocampusának mintáiban a lebontó enzim preszinaptikus elhelyezkedésére utal. Megvizsgáltuk, hogy a neuronális degeneráció befolyásolja-e a monoacilglicerol-lipáz expresszióját a principális sejtekben. A kóros neurofilamentum felhalmozódást jelző fokozott AT8-immunoreaktivitás csökkent – de nem megszűnő - monoacilglicerol-lipáz-immunoreaktivitással párosult az érintett hippocampális piramisisejtekben (53B-C ábra).

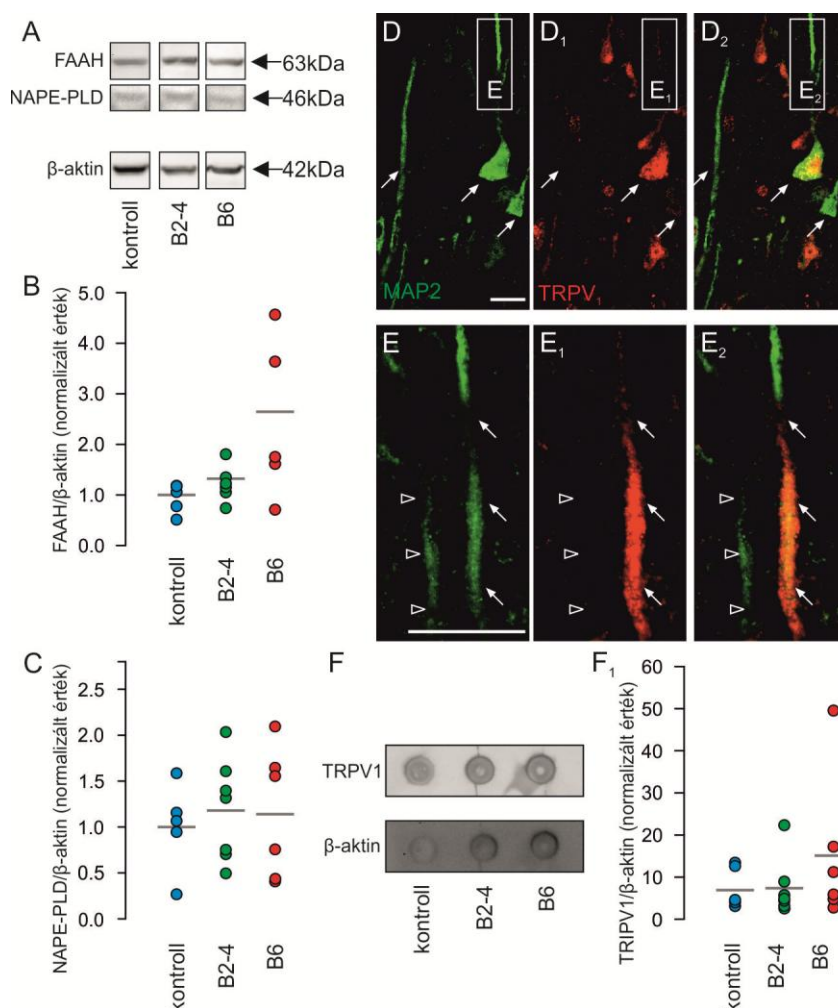


A csökkent neuronális expresszióval egyidőben ugyanakkor számos monoacilglicerol-lipáz<sup>+</sup> mikroglia-sejtet találtuk A $\beta$  plakkok közvetlen közelében, melyek IBA-1-immunoreaktivitást mutattak (53D,D<sub>1</sub> ábra).

### ***Anandamid metabolizmussal kapcsolatos megfigyelések***

A 2-arachidonoil-glicerol mellett a központi idegrendszerben az anandamid nevű endokannabinoid is megtalálható. Hatását - szemben a 2-arachidonoil-glicerollal - ugyanakkor nemcsak CB<sub>1</sub> receptorokon, hanem a TRPV<sub>1</sub> vanilloid receptoron is képes kifejteni, így más hatásmechanizmusokat és szignálrendszert képes aktiválni (Gavva és mtsai, 2004).

Az Alzheimer-kór progressziójával nem találtunk különbséget az anandamid szintézisében vagy lebontásában játszó enzimek mennyiségében. A szintéziséért felelős N-acil-foszfatidil-etanolamin specifikus foszfolipáz D fehérje Western analízissel megállapított szintje a korai/intermedier- és súlyos stádiumú betegségben nem különbözött a kontrollokban mértékétől (54A-C ábra). Az anandamid lebontásáért felelős zsírsav-amid-hidroláz expressziója Braak 6-os stádiumban növekvő tendenciát mutatott, de a nagyobb szórás miatt statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtunk. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a hippocampális piramis-sejtek a TRPV<sub>1</sub> receptort expresszálják, azok sejttestében és apikális dendritjében számos esetben élénk TRPV<sub>1</sub>-immunoreaktivitást detektáltunk (54D-E<sub>2</sub> ábra). Dot-blot analízissel megállapítottuk, hogy a TRIPV<sub>1</sub> vanilloid receptor szintje súlyos Alzheimer-betegségben emelkedő tendenciát mutat, az expresszió szintje statisztikailag ugyanakkor nem mutatkozott szignifikánsnak (54F-F<sub>1</sub> ábra).



**54. ábra.** Alzheimer kóiban a hippocampusban az *N-acil-foszfátidil*-etanolamin specifikus foszfolipáz D és a zsírsav-amid-hidroláz expresszió szintje nem változik (**A-C**). TRPV<sub>1</sub> receptor CA1 piramisisejtek apikális dendritjében (**D-E<sub>2</sub>**, nyílak, a nyílhegyek TRPV<sub>1</sub><sup>+</sup>/MAP2<sup>+</sup> dendritszakaszra mutatnak), és változatlan expressziós szintje Alzheimer-kóiban (**F,F<sub>1</sub>**). Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (**B,C,F<sub>1</sub>**). Lépték: 10  $\mu$ m (**D-E<sub>2</sub>**).

#### 4.5. Sejtproliferációval kapcsolatos megfigyelések a neurodegeneratív változások tükrében

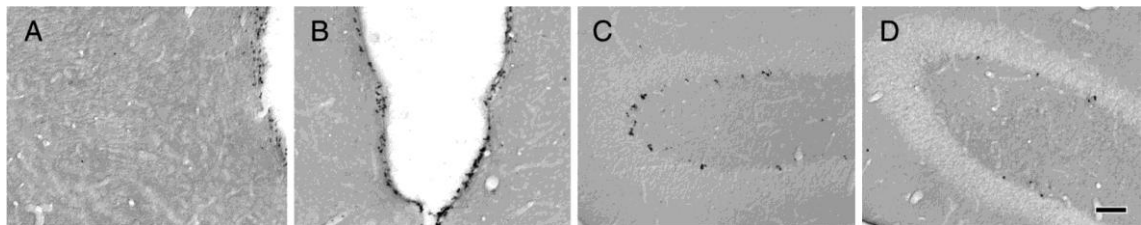
A felnőttkori, központi idegrendszeri neurogenesis mind a fennmaradó neuroplaszticitás egyik pillérköve, mind az idegrendszeri (degeneratív) károsodások elleni küzdelem egyik reményforrása. Felnőtt emlősökben a hippocampus gyrus dentatus szubgranuláris zónájában, és az oldalkamra szubventrikuláris zónájában születhetnek új neuronok. Munkánk első részében megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az enkefalizációs index és várható élettartam az agy neurogenikus képességét. További kísérleteink az Alzheimer-kóiban kulcsszerepet játszó humán amiloid prékurzor fehérje sejtproliferatív hatását, és egy általunk, az ember

szaglólrendszerében azonosított új sejtcsoport Alzheimer-kórban fellépő változásait vizsgálták.

***Sejtprolifерáció és differenciálatlan neuronok alacsony enkefalizációs indexű állatban***

*A sündisznó agyának több területe tartalmaz újonnan született és éretlen neuronokat*

BrdU<sup>+</sup> sejteket nagy számban azonosítottunk a bulbus olfactoriusban, paleo-, archi- és neokortexben valamennyi életkorban. Kamrafalban mind a bulbus olfactoriusban, mind az oldalkamrában találtunk jelölt sejteket. A hippocampusz gyrus dentatusának szubgranuláris zónája különösen a fiatal életkorban bővelkedett BrdU<sup>+</sup> sejtekben (55. ábra).

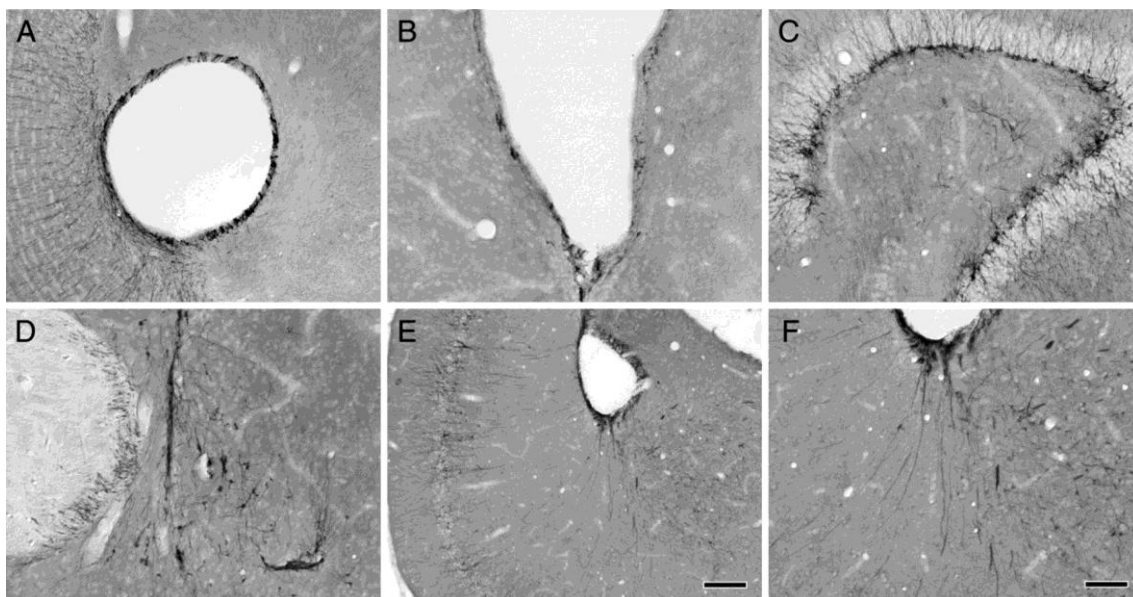


**55. ábra.** BrdU<sup>+</sup> sejtek a bulbaris (A) és a második (B) kamra falában. A gyrus dentatusban a BrdU<sup>+</sup> sejtek előfordulása 3 éves (C) sündisznóban nagyobb volt, mint 7 éves (D) állatban. *Lépték: 100 µm.*

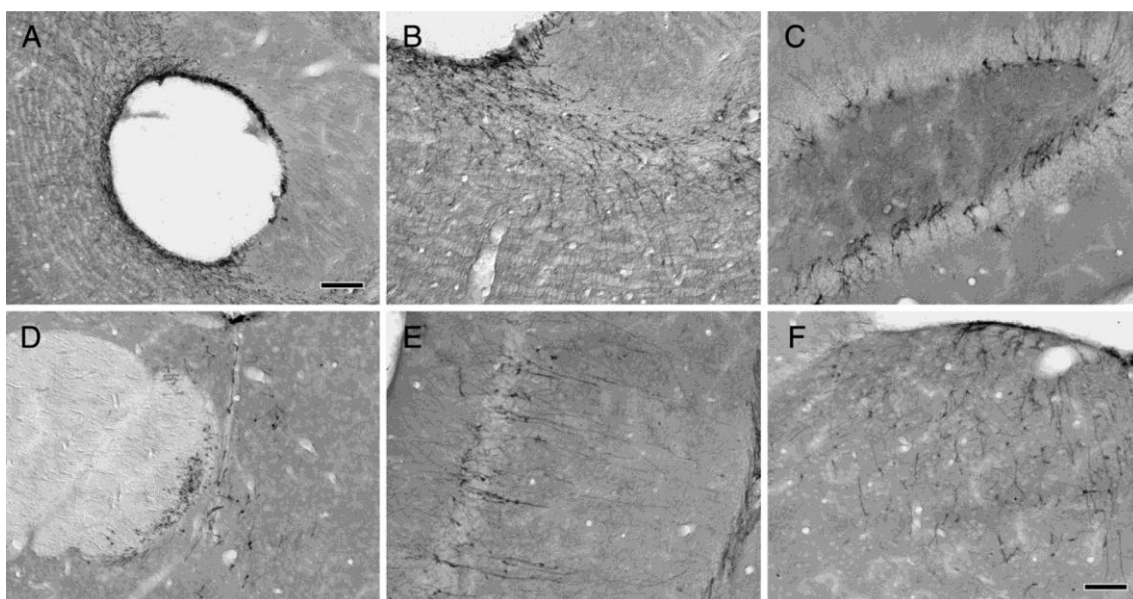
Az éretlen neuronok megjelenítését doublecortin-immunfestéssel végeztük (Seri és mtsai, 2004). A DCX-immunfestés a sejtek citoplazmáját, nyúlványait is láthatóvá tette, így képet nyerhettünk azok morfológiájáról is. A DCX<sup>+</sup> sejtek eloszlási mintázata hasonlított a BrdU<sup>+</sup> sejtek eloszlási mintázatához, de a paleokortexben és neokortexben eltérések is mutatkoztak (56-57. ábrák). A bulbus olfactorius kamrai felszínét sűrűn borították DCX<sup>+</sup> sejtestek (56A ábra). A kamrától távolabb a DCX<sup>+</sup> sejtek sűrűsége csökkent (a bulbus olfactorius külső negyedében már egyáltalán nem találtunk immunoreaktív sejteket), de láthatóvá váltak azok radier irányú nyúlványai (56A ábra). Különösen nagy számban találtunk DCX<sup>+</sup> sejteket a gyrus dentatus szubgranuláris rétegében (56C ábra), míg az indusium griseumban és a neokortexben nem azonosítottunk DCX<sup>+</sup> elemeket.

Életkortól függetlenül találtunk DCX<sup>+</sup> sejteket és nyúlványokat a nucleus accumbensben, az amygdalában és a paleokortex II. rétegében (56D-F ábra, 57D-F

ábra). Ezen utóbbi stratum densocellulareban elhelyezkedő sejtek radier nyúlványai hosszan követhetőek voltak mélyen a III. rétegben is. Elszórtan találtunk DCX<sup>+</sup> sejteket a paleokortex III. rétegében, míg annak első rétegében (56E ábra) és a neokortexben immunoreaktív sejtek nem voltak fellelhetők.



**56. ábra.** Doublecortin-immunoreaktivitás a kétéves sündisznó bulbus olfactoriusában (A), a második kamra szubventrikuláris zónájában (B), a hippocampus gyrus dentatusában (C), a nucleus accumbensben (D) és a paleokortexben (E,F). *Lépték:* 200  $\mu$ m (E), 100  $\mu$ m (A-D, F).

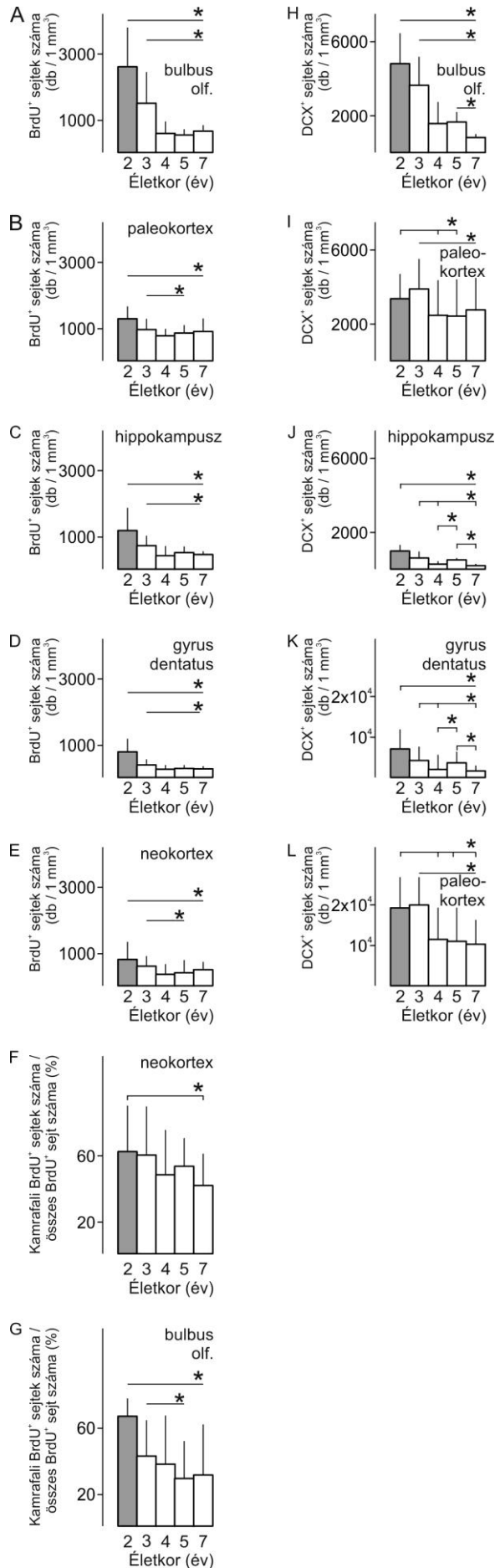


**57. ábra.** Doublecortin-immunoreaktivitás a hétéves sündisznó bulbus olfactoriusában (A,B), gyrus dentatusában (C), a nucleus accumbensben (D), a paleokortexben (E) és az amygdalában (F). *Lépték:* 200  $\mu$ m (A), 100  $\mu$ m (B-F).

*Az életkor előrehaladtával a BrdU<sup>+</sup> és DCX<sup>+</sup> sejtek száma csökken, de jelentős marad*

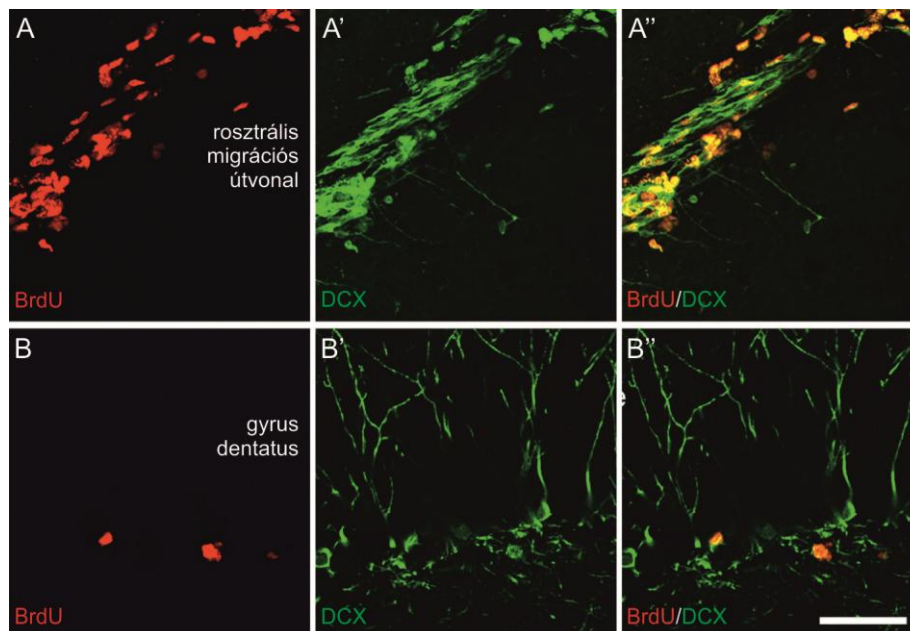
Mind a négy vizsgált területen – így a bulbus olfactoriusban, paleokortexben, hippocampusban és neokortexben – a BrdU<sup>+</sup> sejtek egységnyi agytérfogatra jutó száma fiatalabb, két és három éves állatban jelentősen magasabb volt, mint az idősebb, négy, öt és hét éves állatokban (58A-E ábra). Ehhez hasonlóan a kamrafalban azonosított BrdU<sup>+</sup> sejtek összes BrdU<sup>+</sup> sejthez való számaránya valamennyi régióban magasabb volt a fiatalabb, mint az idősebb állatokban (58F,G ábra).

Hasonló mennyiségi változásokat találtunk az életkor függvényében a DCX<sup>+</sup> sejtek esetén is (58H-L ábra). Külön megvizsgáltuk a gyrus dentatus szubgranuláris, és a paleokortex II. rétegét, melyek legnagyobb sűrűségben tartalmaztak DCX<sup>+</sup> sejteket; ezek a vizsgálatok is az előzőekkel egyező eredményekre vezettek (58K,L). A neokortexben ugyanakkor semmilyen életkorban nem találtunk DCX<sup>+</sup> elemeket.



**58. ábra.** A BrdU<sup>+</sup> sejtek sűrűsége a bulbus olfactoriusban (A), paleokortexben (B), hippocampusban (C), gyrus dentatusban (D) és a neokortexben (E) az életkorral csökken, de még hétéves állatokban is számottevő, hasonlóan a neokortikális (F) és bulbaris (G) kamrafali neuronokhoz. DCX<sup>+</sup> sejtek sűrűsége a bulbus olfactoriusban (H), paleokortexben (I), hippocampusban (J), a gyrus dentatus szubgranuláris rétegében (K) és a paleokortex második rétegében (L). Átlag ± standard hiba, \**p* < 0,05 (A-L).

A rostrális migrációs útvonalban, az endidíma mentén BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> sejtek gazdag csoportját találtuk, ahogyan azt a három éves állatból származó ábrán mutatjuk (59A-A'' ábra). A gyrus dentatusban a DCX<sup>+</sup> sejtek csak elvétve mutattak BrdU-immunoreaktivitást (59B-B'' ábra).

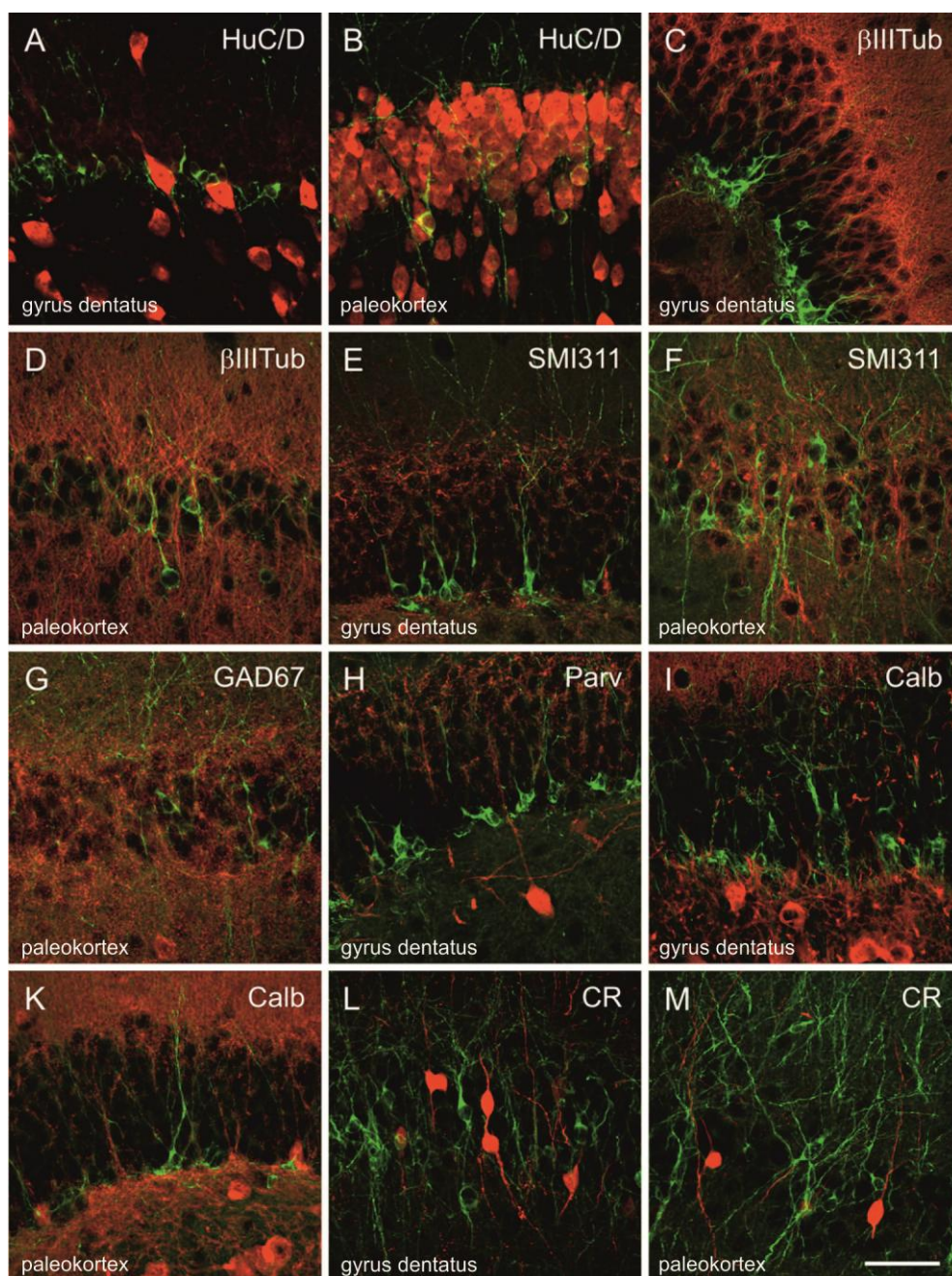


**59. ábra.** BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> sejtek sokasága a rostrális migrációs útvonalban hároméves tenrekben (A-A''). A gyrus dentatusban kevés DCX<sup>+</sup> sejtben azonosítottunk BrdU-immunoreaktivitást (B-B'') két éves sündisznóban. Lépték: 75  $\mu$ m.

*A DCX<sup>+</sup> sejtek nem koexpresszálják a differenciált neuronokra jellemző markereket*

A kettő- és öt éves állatok agymetszetein készült többszörös immunhisztokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a pan-neuronális HuC/D marker (Härtig és mtsai, 2009) a gyrus dentatusban csak DCX<sup>-</sup> sejteket jelenített meg (60A ábra), és a paleokortexben is csak elvétve találtunk HuCD<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> neuronokat (60B ábra). Hasonlóképpen, a jellegzetesen idegsejteket jelölő  $\beta$ -III-tubulint és SMI311-t is csak DCX<sup>-</sup> negatív sejtek expresszálták (60C-F ábra), de a GAD67<sup>+</sup>, parvalbumin<sup>+</sup>, calbindin<sup>+</sup> és calretinin<sup>+</sup> elemek is DCX-immunonegatívak maradtak, mind a hippocampusz gyrus dentatusában, mind a paleokortexben (60G-M ábra).





**60. ábra.** Doublecortin (Cy2, zöld) és különböző neuronális markerek (Cy3, piros) detektálása a gyrus dentatus szubgranuláris zónájában (**A,C,E,H,I,L**) és a paleokortex II. rétegében (**B,D,F,G,K,M**), kétéves sündisznóban. Lépték: 50  $\mu$ m.

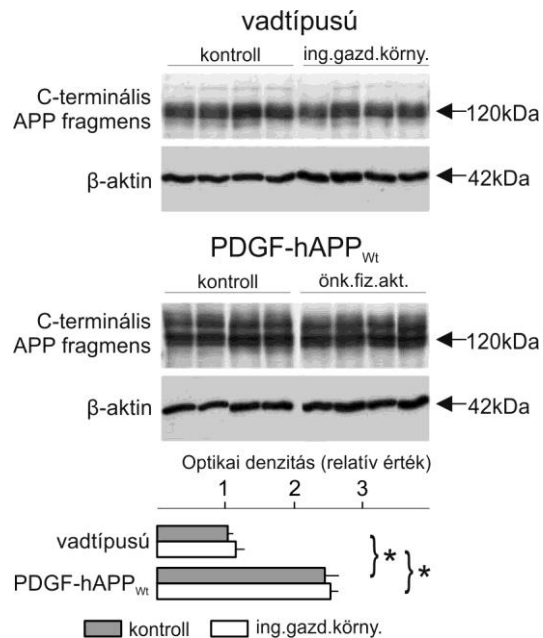
### ***A humán vad típusú amiloid prékurzor fehérje neurogenetikus hatása***

*Az ingergazdag környezet nem befolyásolja a humán vad típusú amiloid prékurzor fehérje expressziós szintjét.*

Előző kísérleteinkkel összhangban megállapítottuk, hogy a vizsgált PDGF-hAPP<sub>WT</sub> I5 egerek agyában az amiloid prékurzor fehérje szintje kétszerese a vad típusúakban



mértnek ( $F_{1,36} = 70,17$ ,  $*p < 0,001$ ; 61. ábra). Az ingergazdag környezet ugyanakkor genotípustól függetlenül nem befolyásolta a vizsgált protein expressziós szintjét ( $F_{1,36} = 2,26$ ,  $p > 0,05$ ; 61. ábra).

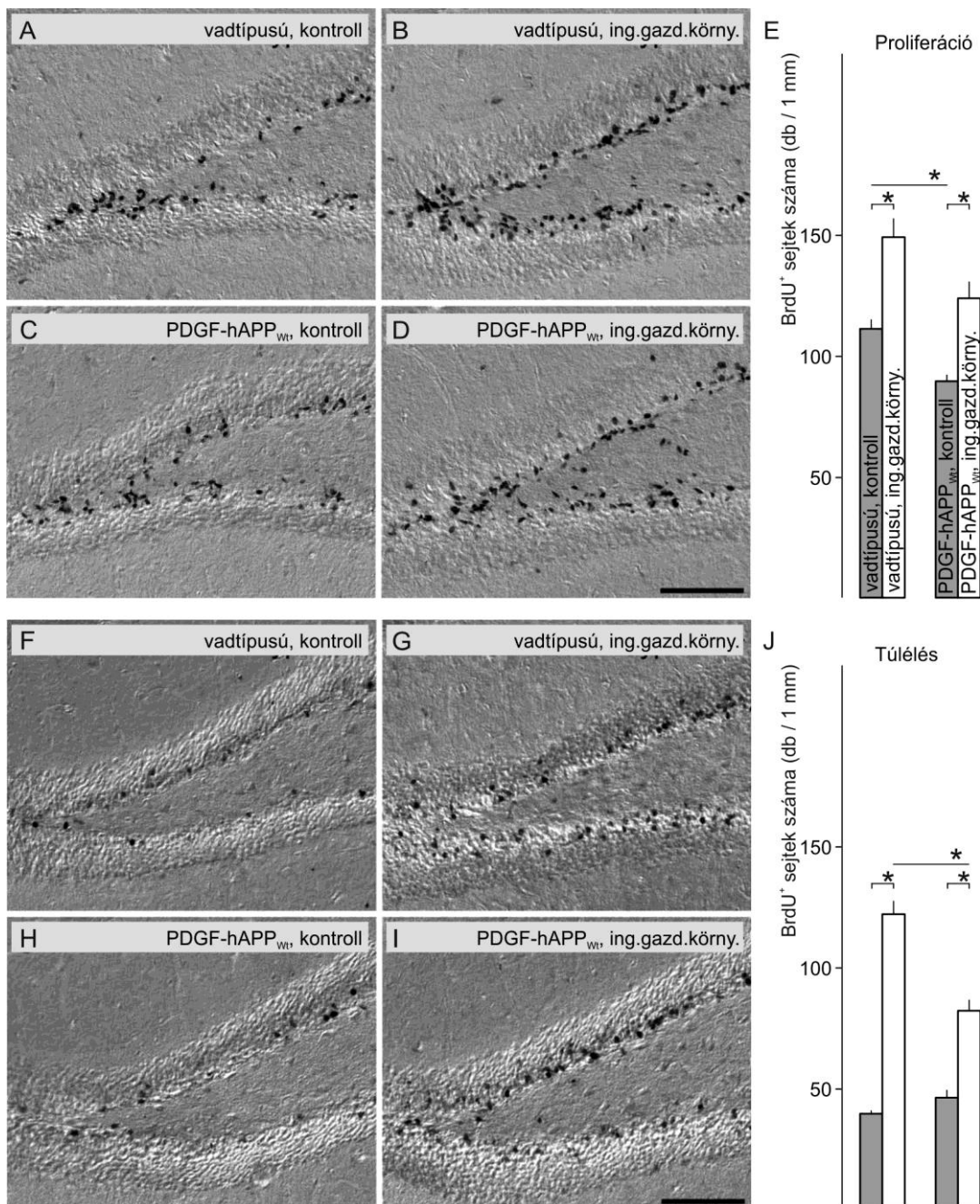


**61. ábra.** Az amiloid prékurzor molekula C-terminális fragmensének szintjét az ingergazdag környezet sem a vadtípusú, sem a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> transzgenikus állatban nem befolyásolta. Átlag ± standard hiba,  $*p < 0,05$ .

#### *A PDGF-hAPP<sub>wt</sub> 15 egerek gyrus dentatus szubgranuláris rétegében a sejtprolifерáció csökken*

Az osztódó sejteket tizenegy napon keresztül jelöltük intraperitoneálisan bejuttatott BrdU-val, majd egy nappal az utolsó injekció után végeztük mennyiségi vizsgálatunkat az immunfestett metszeteken. Statisztikai (ANOVA) analízisünk rávilágított, hogy mind a genotípus ( $F_{1,16} = 10,26$ ,  $*p < 0,01$ ), mind az állattartási körülmény ( $F_{1,16} = 27,08$ ,  $*p < 0,001$ ) befolyásolja a sejtprolifерációt (62A-E ábra). A post-hoc analízisek kimutatták, hogy normál állatházi körülmények között a vadtípusú állatokban jelentősen több BrdU<sup>+</sup> sejt található, mint a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> 15 egerek megegyező agyterületén ( $*p < 0,001$ ; 62A,BE ábra). Ingergazdag környezetben mind a vadtípusú (32%,  $*p < 0,05$ ), mind a transzgenikus állatokban (42%,  $*p < 0,01$ ) jelentősen több BrdU<sup>+</sup> sejtet találtunk a normál állatházi körülményekhez hasonlóan (62A-E ábra). A genotípus és az állatházi körülmények ugyanakkor egymástól függetlenül befolyásolták a sejtprolifерációt,

statisztikailag szignifikáns kapcsolatot nem mutattunk ki ( $F_{1,36} = 0,003$ ,  $p > 0,05$ ), így a genotípusok között sejtett relatív növekedés nem fedett valódi különbséget (62E ábra).



**62. ábra.** A humán amiloid prékurzor fehérje expresszió és az állattartási körülmények hatása a sejt szaporulatra és a sejtek túlélésére. 1 nappal az injekció után a gyrus dentatus szubgranuláris zónájában standard körülmények között a BrdU<sup>+</sup> sejtek száma a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> egerekben alacsonyabb, míg ingergazdag környezetben a genotípustól függetlenül megnövekedett (A-E). Négy héttel az injekció után genotípustól függetlenül több BrdU<sup>+</sup> sejtet találtunk, azok abszolút száma vad típusú egerekben magasabb volt (F-J). A túlélési arányt a prolif táblázat mutatja. Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (E,J). Lépték: 100  $\mu$ m (A-D, F-I).

*A humán amiloid prékurzor fehérje expressziója növeli az újonnan született sejtek túlélését*

A BrdU<sup>+</sup> túlélő sejtek számát az utolsó BrdU injekció után négy héttel határoztuk meg. Mind a genotípus ( $F_{1,16} = 7,48$ ,  $*p < 0,05$ ), mind az állattartási körülmények ( $F_{1,16} = 120,60$ ,  $*p < 0,05$ ) befolyásolták az újonnan született sejtek túlélését. A genotípus és az állattartási körülmények egymástól függően befolyásolták a sejt túlélést ( $F_{1,16} = 18,96$ ,  $*p < 0,001$ ); az állatháztartási körülmény megváltozása okozta sejt túlélési arány vad típusú és transzgenikus állatokban különbözően alakult (62F-J ábra). Normál állatházi körülmények között tartott egerekben a BrdU<sup>+</sup> sejtek száma az amiloid prékurzor fehérje expressziójától független volt ( $p > 0,05$ ; 62J ábra). A kezdetben mért BrdU<sup>+</sup> sejtek számához viszonyítva a négy hetes túlélési arány a transzgenikus állatokban (52%) ugyanakkor jelentősen magasabb volt, mint a vad típusú egerekben (34%) (18. táblázat,  $F_{1,8} = 24,14$ ,  $*p < 0,001$ ).

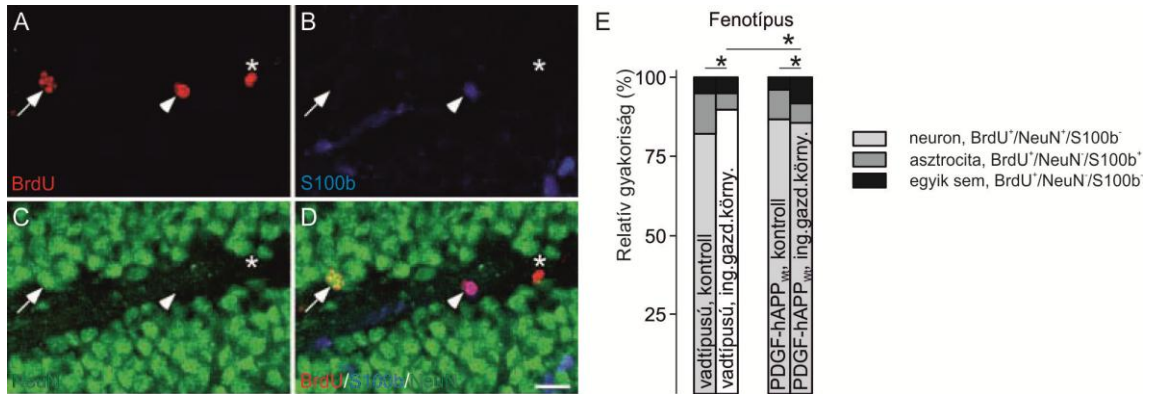
Az ingergazdag környezet jelentősen megnövelte a túlélő sejtek számát mind a vad típusú (312%,  $*p < 0,001$ , vs. normál állatházi körülmények; 62F,G,J), mind a transzgenikus populációban (175%,  $*p < 0,01$ , vs. normál állatházi körülmények; 62H-J ábra). A túlélő sejtek abszolút száma a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egerekben jelentősen elmaradt a vad típusúakban számoltakhoz képest ( $*p < 0,001$ ; 62J ábra). A BrdU<sup>+</sup> sejtek négy hetes túlélési aránya mind vad típusú (80%), mind transzgenikus (64%) egerekben jelentősen javult, ha az állatokat ingergazdag környezetben tartottuk, genotípusbeli különbséget ebben a vonatkozásban ugyanakkor nem találtunk (18. táblázat,  $F_{1,8} = 0,91$ ,  $p > 0,05$ ).

Összességében megállapíthatjuk, hogy a humán amiloid prékurzor fehérje expressziója változatos módon befolyásolja a szemcsesejtek proliferációját és túlélését a hippocampus gyrus dentatusában. Normál állatházi körülmények között a fehérje expressziója csökkenti a neurogenézist, de növeli a sejtek túlélését. Ingergazdag körülmények között tartott állatokban a sejtek proliferációja növekszik; ezt a humán amiloid prékurzor fehérje expressziója ugyanakkor nem befolyásolja.

*Neuronális és gliális differenciálódás az állatházi körülmények és a humán amiloid prékurzor fehérje expressziójának függvényében*

Az utolsó BrdU injekció után négy héttel a túlélő sejtek differenciálódási irányát többszörös immunhisztokémiai jelölésekkel vizsgáltuk meg (63. ábra). A BrdU<sup>+</sup> sejtek legnagyobb arányban mind a négy kísérleti csoportban (82,6-90,6%) NeuN<sup>+</sup> neuronok voltak. Normál állatházi körülmények között a BrdU<sup>+</sup> sejtek fenotípus szerinti eloszlása (NeuN<sup>+</sup> neuron vagy S100b<sup>+</sup> asztrocita) nem mutatott genotípusos különbséget ( $p > 0,05$ ), míg ingergazdag környezetben tartott vad típusú – de nem transzgenikus –

egerekben a neuronális és gliális differenciálódás aránya megváltozott (\* $p < 0,001$ , vs. normál állatházi körülmények). Ebben a csoportban az asztrociták aránya csökkent (normál állatházi körülmény: 12,6% vs. ingergazdag környezet: 4,9%), míg a neuronoké nőtt (normál állatházi körülmény: 82,6% vs. ingergazdag környezet: 90,6%), a BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>/S100b<sup>-</sup> sejtek aránya változatlan maradt (normál állatházi körülmény: 4,8% vs. ingergazdag környezet: 4,4%).



**63. ábra.** BrdU<sup>+</sup> sejtek fenotípusa 4 héttel az injekció után BrdU (A), S100b (B) és NeuN (C) immunhisztokémia alapján. A BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>/S100b<sup>-</sup> (*nyíl*), BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>/S100b<sup>+</sup> (*nyílhegy*) és BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>-</sup>/S100b<sup>-</sup> (*csillag*) sejtek aránya az állattartási körülmények hatására változott meg a vad típusú és PDGF-hAPP<sub>wt</sub> egerekben (E). Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (E). Lépték: 20  $\mu$ m (A-D).

PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egerekben a BrdU<sup>+</sup>/S100b<sup>+</sup> asztrociták (összes BrdU<sup>+</sup> sejthez viszonyított) aránya jelentősen csökkent (normál állatházi körülmény: 9,4% vs. ingergazdag környezet: 6,5%, \* $p < 0,01$ ), míg a BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>/S100b<sup>-</sup> (összes BrdU<sup>+</sup> sejthez viszonyított) aránya növekedett (normál állatházi körülmény: 3,4% vs. ingergazdag környezet: 7,1%, \* $p < 0,01$ ), a BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> neuronok aránya változatlan maradt (normál állatházi körülmény: 87,2% vs. ingergazdag környezet: 86,4%,  $p > 0,05$ ).

Eredményeinket összegezve megállapítottuk, hogy mind az állatházi körülmények, mind a humán amiloid prékurzor fehérje befolyásolja az újonnan született sejtek differenciálódását. Az ingergazdag környezet vad típusú állatokban segítette a neuronná való differenciálódást, ezt a jelenséget a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> I5 egértörzs állataiban ugyanakkor nem figyeltük meg.

### ***Differenciálatlan neuronok az ember szaglórendszerében***

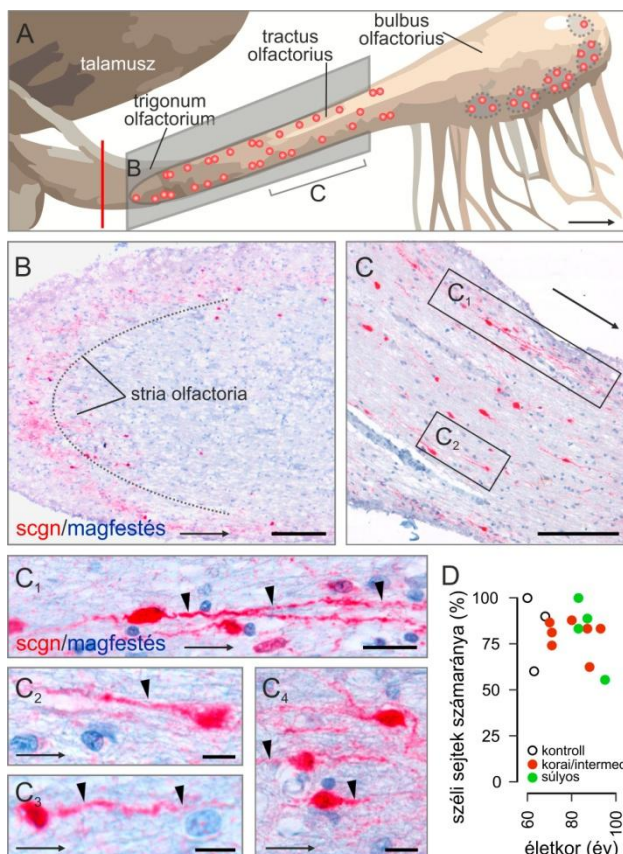
Az Alzheimer-kór egyik korai tünete a szaglási képesség károsodása. Humán mintákon egy új neuron csoportot azonosítottunk az olfactoros rendszerben, nem csak a bulbus olfactoriusban, hanem az eddig „idegsejtmentesnek” hitt tractus olfactorius,

valamint a trigonum olfactorium és a striae olfactoriae területén. A sejtek azonosítását egy nemrég felfedezett kalcium-szenzor fehérje, a secretagogin detektálhatósága tette lehetővé (Wagner és *mtsai*, 2000). A sejtek helyzete és morfológiája a rágcslókban leírt rostrális migrációs útvonalban azonosítottakra hasonlított. Patológiás mintáinkon megvizsgáltuk, hogyan változik ezen sejtek túlélése a neurodegeneratív Alzheimer-kórban.

### **Secretagogin expresszáló neuronok a tractus olfactoriusban**

*Az ember tractus olfactoriusának perifériás részén bipoláris sejteket találunk, melyek secretagogin tartalmuk alapján azonosíthatók*

A tractus olfactorius egész hosszában 8-15  $\mu\text{m}$  nagyságú, secretagogin<sup>+</sup>, bipoláris sejteket azonosítottunk annak perifériás, „héjszerű” területén (64A-C<sub>4</sub> ábra). Jellegzetes helyzetük alapján a sejteket „shell-cells”-nek neveztük el. Jóllehet nagy számban láttuk őket mind itt, mind a stria olfactoriákban, nem alkottak olyan sűrű sejtlancolatot, mint a rágcslók rostrális migrációs útvonalának sejtjei. A bipoláris sejtek bulbus olfactorius felé néző nyúlványa két vagy három, egyenlő hosszúságú ágra vált szét, melyet secretagogin tartalmuk (immunfestésük) alapján tudtunk azonosítani (64C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ábra).

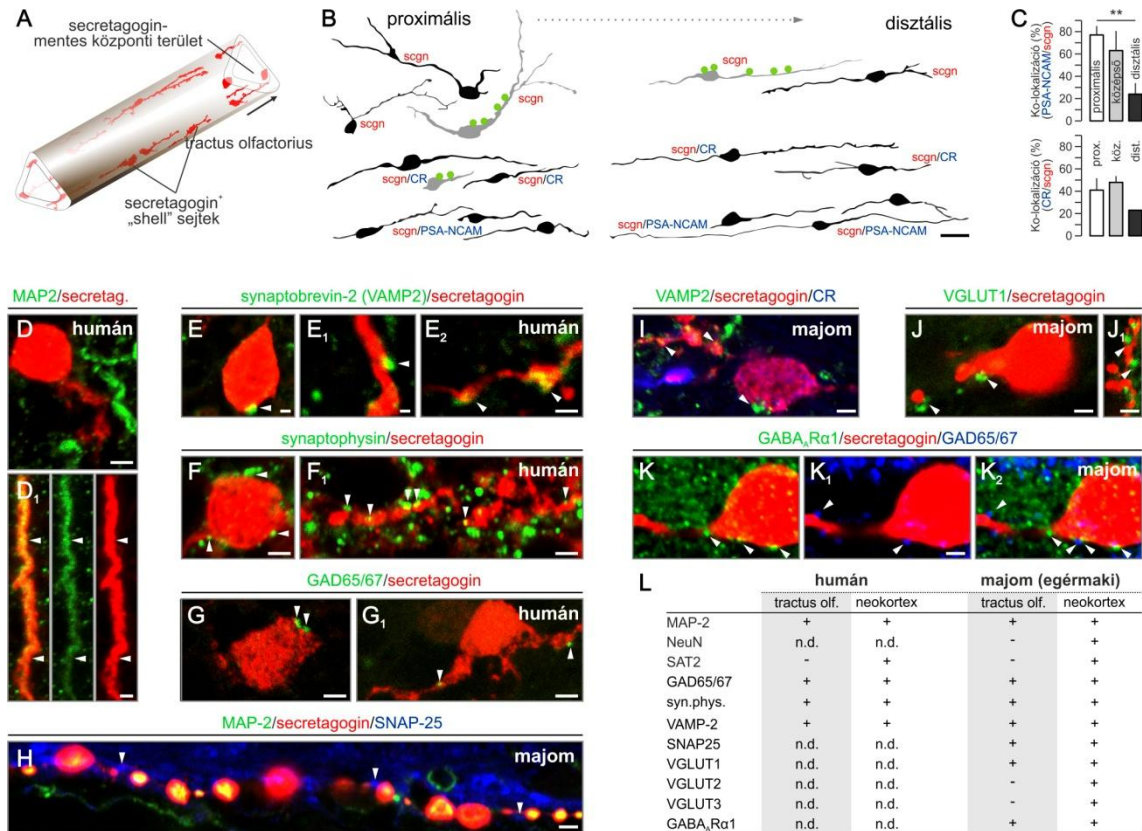


**64. ábra.** Secretagogin tartalmú neuronok az ember tractus és bulbus olfactoriusában (A, a piros vonal a mintavétel határát jelzi a trigonum olfactorium magasságában, a piros körök a sejtek helyét mutatják). A trigonum olfactorium (B) és a tractus olfactorius (C) széli régiójában számos immunopozitív sejtet találtunk. A bipoláris neuronok pólusairól nyúlványok azonosíthatók, melyek elágazódhattak (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, nyílhegyek). A sejtek száma az életkortól és az Alzheimer-kór stádiumától függetlenül alakult (D). A nyilak a bulbus olfactorius felé mutatnak (A-C<sub>4</sub>). Lépték: 250  $\mu\text{m}$  (B,C), 20  $\mu\text{m}$  (C<sub>1</sub>), 10  $\mu\text{m}$  (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>).



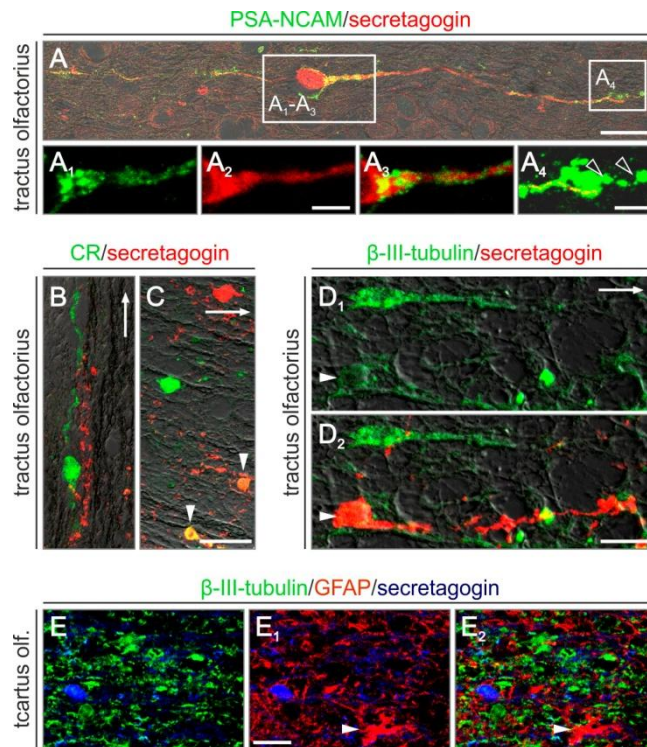
*A tractus olfactorius bipoláris sejtjei preszinaptikus profilokkal borítottak, de plaszticitás-markereket is expresszálhatnak*

Humán mintáinkon DCX-immunreaktivitást nem tudtunk kimutatni, és a secretagogin<sup>+</sup> sejtek a vizsgált majomfajban is DCX-immunonegatívak maradtak. A tractus olfactoriusban ugyanakkor erős PSA-NCAM expressziót találtunk (65B, 66A ábra), mely a neuronális strukturális plaszticitás jellemző markere. Gyakran azonosítottunk a tractus olfactorius héjszerű régiójában PSA-NCAM<sup>+</sup>/secretagogin<sup>+</sup> és calretinin<sup>+</sup>/secretagogin<sup>+</sup> sejteket is, melyek száma a bulbus olfactorius felé haladva csökkent (65B,C, 66BC ábrák). A tractus olfactorius secretagogin<sup>+</sup> sejtjei gyakran koexpresszáltak  $\beta$ -III-tubulint (TUJ1-t), egy differenciálatlan neuronokra jellemző markert, de nem expresszáltak GFAP-t, mely a vizsgált secretagogin<sup>+</sup> sejtpopuláció neuronális eredetére utal (66D-E<sub>2</sub> ábra).



**65. ábra.** A tractus olfactoriusban talált perifériás széli helyzetű secretagoin neuronok (A) nagy része bipoláris alakú volt, melyek PSA-NCAM- vagy calretinin-immunoreaktivitást mutathattak (B), ezen markerek ko- expresszójának gyakorisága a bulbus olfactorius felé közelítvecsökkent (C). A secretagoin<sup>+</sup> sejtek (D) nyúlványai ritkán MAP2-immunoreaktivitást mutattak (D<sub>1</sub>), sejttestük vagy nyúlványuk felszínén szinaptobrevin-2<sup>+</sup> (E-E<sub>2</sub>), szinaptofizin<sup>+</sup> (F,F<sub>1</sub>), GAD65/67<sup>+</sup> (G,G<sub>1</sub>) és SNAP-25<sup>+</sup> (H) profilokat találtunk. Egérmakiban a secretagoin<sup>+</sup> sejttestek több esetben calretinin-immunoreaktívak voltak (I), felszínükön szinaptobrevin-2<sup>+</sup> (I), VGLUT1<sup>+</sup> (J,J<sub>1</sub>) és GABAAR $\alpha$ 1<sup>+</sup> (K-K<sub>2</sub>) profilokat azonosítottunk. Sejtidentitás markerek és preszinaptikus markerek, receptorok listája (L). Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (C). Lépték: 10  $\mu$ m (B), 3  $\mu$ m (D,E<sub>2</sub>,F,G,G<sub>1</sub>), 2  $\mu$ m (D<sub>1</sub>,F<sub>1</sub>,H,I,I<sub>1</sub>,J-K<sub>2</sub>).

A tractus olfactoriusban talált secretagoin<sup>+</sup> sejtek csak kis hányada expresszált differenciált neuronokra jellemző markereket, így azok többnyire NeuN- és SAT2-immunonegatívak maradtak (65L ábra), MAP2 fehérjét ritkán expresszállhattak (65D,D<sub>1</sub> ábra). Sejttestjeik és dendritjeik közvetlen felszínén szinaptobrevin-2<sup>+</sup>, szinaptofizin<sup>+</sup> és GAD65/67<sup>+</sup> profilokat is azonosítottunk (65E-G<sub>1</sub>,L ábra). A humán minták mellett majom (*Microcebus murinus*, egérmaki) tractus olfactoriusában is azonosítottunk secretagoin<sup>+</sup> bipoláris sejteket, melyek felszínén hasonló neurokémiai jellegű preszinaptikus profilokat különböztethettünk meg, beleértve a VGLUT1<sup>+</sup> és emellett a posztiszinaptikus receptor (GABA<sub>A</sub>Rα1<sup>+</sup>) struktúrákat is (65I-K<sub>2</sub> ábra).



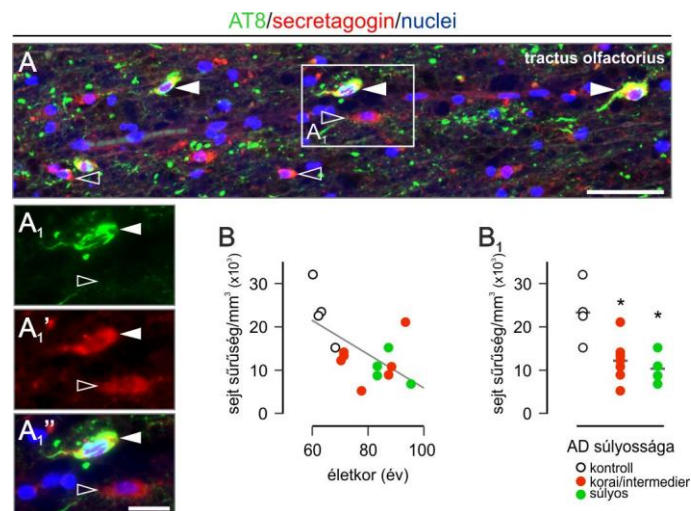
**66. ábra.** A tractus olfactorius secretagoin<sup>+</sup> neuronjai PSA-NCAM<sup>+</sup> mátrixszal voltak borítva (**A-A<sub>4</sub>**). Bipolárisan húzódó nyúlványaik calretinin<sup>+</sup> nyúlványokkal párhuzamosan helyezkedtek el (**B**), vagy azzal ko-lokalizáltak (**C**, *nyílhegy*). A secretagoin<sup>+</sup> sejtek β-III-tubulint igen (**D<sub>1</sub>,D<sub>2</sub>**, *nyílhegyek*), de GFAP-t nem expresszáltak (**E-E<sub>2</sub>**, *nyílhegy*). *Lépték:* 20 μm (**B,C**), 10 μm (**A,D<sub>2</sub>**), 7 μm (**E<sub>1</sub>**), 5 μm (**A<sub>2</sub>**), 2 μm (**A<sub>4</sub>**).

### **A secretagoin expressziójának változásai Alzheimer-kórban**

Ezeket a vizsgálatokat Alzheimer-kórban elhunytakból és velük életkorban megegyező, de Alzheimer-kórban nem szenvedő elhunytakból nyert mintákon végeztük. Az AT8<sup>+</sup> hiperfoszforilált tau fehérjét tartalmazó olfactoros neuronok sűrűsége a Braak-stádiumokkal arányban változott.

A tractus olfactorius secretagoin<sup>+</sup> sejtjei számos esetben tartalmaztak AT8<sup>+</sup> hiperfoszforilált tau fehérjét (67A-A<sub>1</sub>'' ábra). Megfigyeltük, hogy a secretagoin<sup>+</sup> sejtek

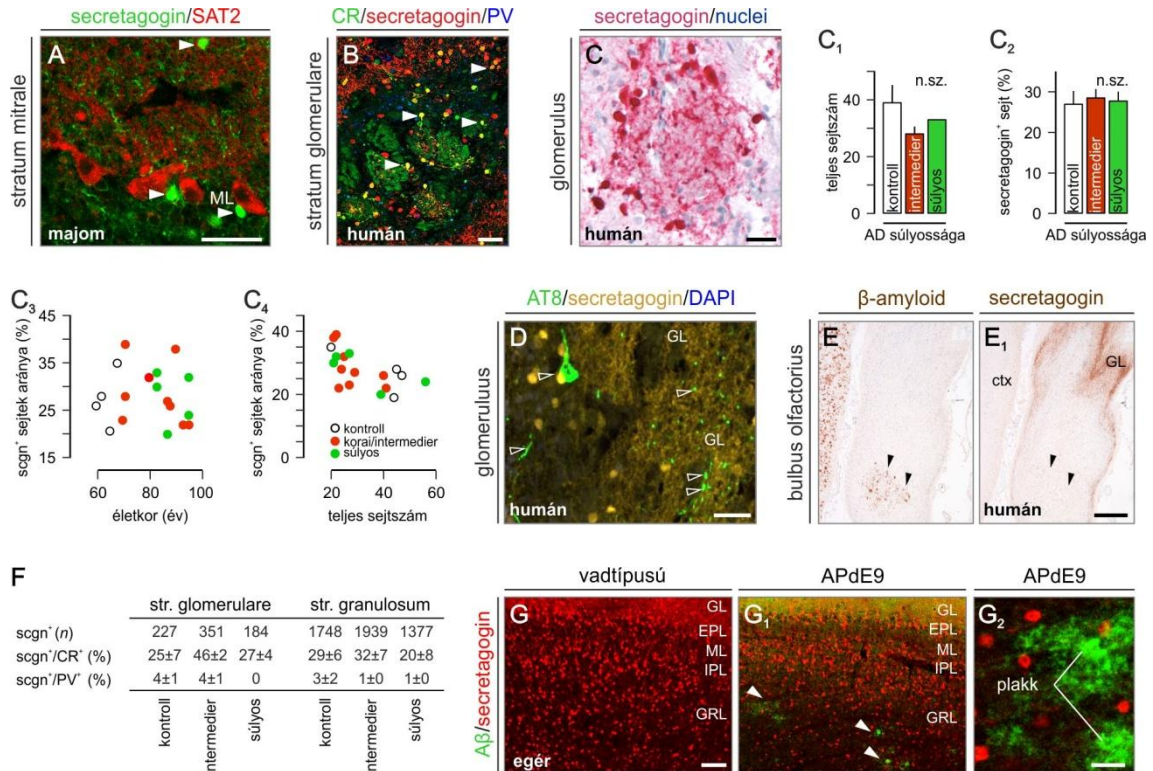
száma az életkorral (67B ábra), még kifejezettebben a neurodegeneratív folyamat előrehaladtával (67C ábra) csökken. Ezzel ellentétben a bulbus olfactoriusban azonosított secretagoin<sup>+</sup> sejtek (68A-C ábra) száma (68C<sub>1</sub> ábra), sem azok glomerulusban képviselt aránya (68C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> ábra) nem változott az életkorral. Secretagoin<sup>+</sup> periglomeruláris neuronokban nem figyeltünk meg AT8<sup>+</sup> hiperfoszforilált tau felhalmozódást sem, jóllehet AT8<sup>+</sup> profilokat nagy számban találtunk ebben a régióban (68D ábra). Extracelluláris A $\beta$  plakkokat a bulbus olfactorius periglomeruláris régiójában nem tudtunk detektálni (68E,E<sub>1</sub> ábra).



**67. ábra.** A tractus olfactorius secretagoin<sup>+</sup> neuronjai Alzheimer-kórban AT8-immunoreaktivitást mutatnak (**A-A<sub>1</sub>'**), számuk az életkorral (**B**) és a betegség súlyosbodásával (**B<sub>1</sub>**) csökken. Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$  (**B,B<sub>1</sub>**). *Lépték:* 20  $\mu$ m (**A**), 10  $\mu$ m (**A<sub>1</sub>-A<sub>1</sub>'**).

Külön vizsgáltuk, megőrzik-e a secretagoin<sup>+</sup> sejtek azon képességüket, hogy további Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjéket expresszálnak. A statisztikai analízishez szükséges nagy sejtszám biztosításához granuláris, külső plexiform és glomeruláris rétegi sejteket vontunk be vizsgálatainkba (68F ábra). Míg calbindin expressziót humán mintáinkon nem detektáltunk, a parvalbumin<sup>+</sup> neuronok az egészséges és Alzheimer-kórban elhunytakból nyert mintákban sem ko-expresszáltak secretagoint. A calretinin<sup>+</sup>/secretagoin<sup>+</sup> sejtek aránya korai Alzheimer-kórban mérsékelt, de statisztikailag nem jelentős emelkedést mutatott, míg előrehaladott betegségben nem tudtunk különbséget kimutatni (68F ábra).





**68. ábra.** Secretagogen+ sejtek a bulbus olfactoriusban a SAT2<sup>+</sup> mitrális sejtek között (A, *nyílhegyek*). A periglomeruláris secretagogen<sup>+</sup> interneuronok calretinin-immunoreaktivitást mutathattak (B, *nyílhegyek*). A secretagogen<sup>+</sup> periglomeruláris neuronok száma (C<sub>1</sub>) és aránya (C<sub>2</sub>) az Alzheimer-kór előrehaladtával nem változott, az életkorral (C<sub>3</sub>) és a betegség súlyosságával (C<sub>4</sub>) nem korrelált. A bulbus olfactoriusban a secretagogen+ neuronok AT8-immunonegatívak maradtak (D), az amiloid-lerakódással komplementer eloszlást mutattak (E, E<sub>1</sub>). Secretagogen ko-lokalizációja más kalciumkötő fehérjékkel (F). A secretagogen<sup>+</sup> neuronok eloszlását nem befolyásolta az APdE9 transzgenikus egérmódelben megfigyelt Aβ lerakódás (G-G<sub>2</sub>). Átlag ± standard hiba,  $p > 0,05$  (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>). **Rövidítések:** GL stratum glomerulare, EPL stratum plexiforme externum, ML stratum mitrale, IPL stratum plexiforme internum, GRL stratum granulosum. **Lépték:** 300 μm (E<sub>1</sub>), 140 μm (G<sub>1</sub>), 50 μm (A-C), 30 μm (D), 25 μm (G<sub>2</sub>).

*A β-amiloid lerakódás nem befolyásolja a secretagogen<sup>+</sup> sejtek eloszlását és fenotípusát az APdE9 transzgenikus egérmódelben*

Az APdE9 egerek bulbus olfactoriusában masszív amiloid plakk lerakódást figyeltünk meg (68G-G<sub>2</sub> ábra). Transzgenikus egérmódelünkben csak a bulbus olfactoriusban történt változásokat tudtuk vizsgálni, mert egerekben egy tractus olfactoriusnak megfelelő struktúra nem azonosítható.

A transzgenikus állatokban megfigyelt Aβ lerakódás nem okozott szerkezeti változásokat azok olfactoros rendszerében (68G-G<sub>2</sub> ábra). A rostrális migrációs útvonalban azonosított secretagogen<sup>+</sup> sejteket genotípustól függetlenül hasonló számban léptek be a bulbus olfactoriusba (vadtípusú:  $6,6 \pm 0,6$  vs. APdE9:  $8,4 \pm 1,3$ , sejtek száma/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0,1$ ). Sem a bulbus olfactoriusban, sem a nucleus olfactorius

accessoriusban nem találtunk kvalitatív különbséget sem a sejtek fenotípusában, sem eloszlásukban vagy eloszlási gyakoriságukban.

#### **4.6. Az extracelluláris mátrix perineuronális kompartmentalizációja és neurodegeneratív folyamatokban betöltött szerepe**

A központi idegrendszer szűk sejtközi terét extracelluláris mátrix tölti ki, mely a neuronok különböző részei körül változatos kémiai összetételű megjelenési formákat ölt. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogyan függ az extracelluláris mátrix kialakulása a neuronok differenciáltságától, milyen a periszinaptikus mátrix állomány kémiai összetétele, és hogyan változik, milyen szerepet játszhat a perineuronális mátrix Alzheimer-kórban. Figyelmünket elsősorban az aggregán és brevikan nevű lektikánokra fordítottuk, mert ezek a fejlett (differenciálódott) központi idegrendszer extracelluláris mátrixának legfontosabb perineuronális és periszinaptikus komponensei (Blosa és *mtsai*, 2013; Morawski, Brückner, Arendt, és *mtsai*, 2012).

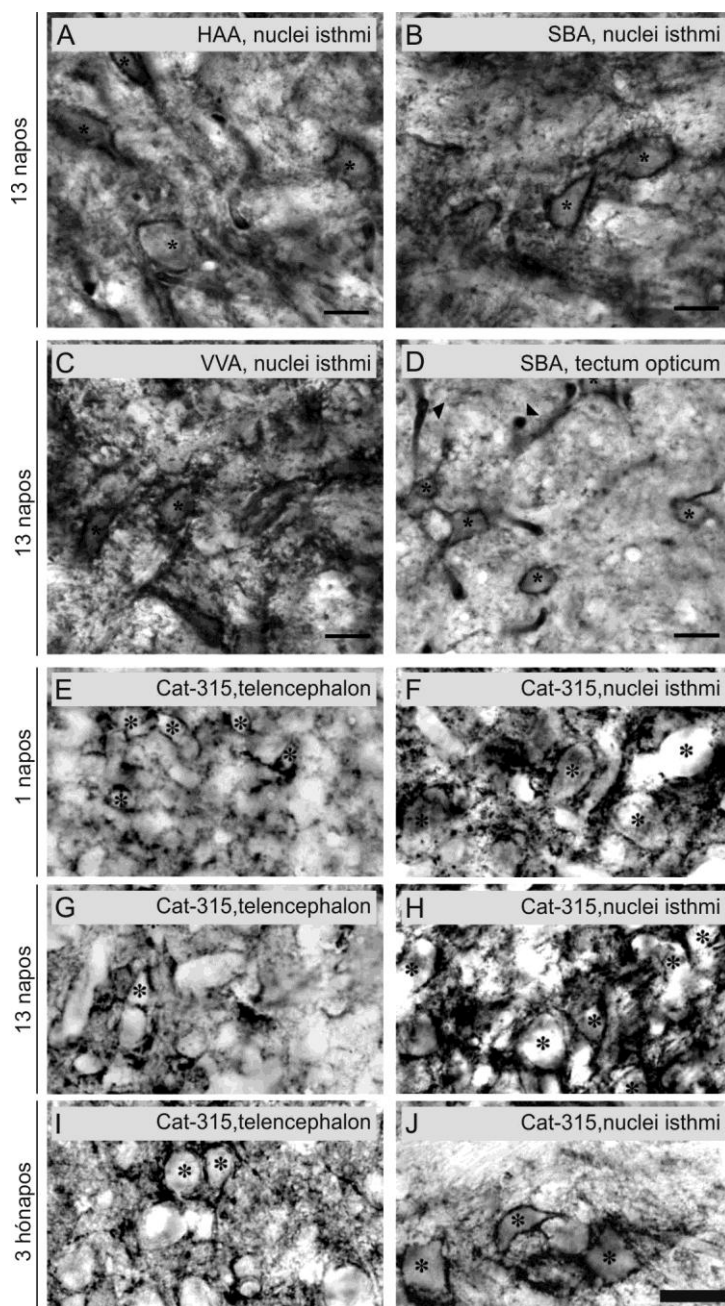
#### ***Filogenetikai kitekintés: az extracelluláris mátrix rendeződése a differenciált neuronokkal világra jövő házi csirke (Gallus domesticus) agyában***

Az összehasonlító-anatómiai vizsgálatok nélkülözhetetlen kiegészítői az emlősökben folytatott idegrendszeri vizsgálatoknak. Ebben a kísérletkörben megmutattuk, hogy az agyi perineuronális mátrix kémiai összetétele a törzsfajlás folyamán nagyban megőrzött. A differenciált neuronokkal születő házi csirke modelljét használva (Tömböl, 1988) bizonyítottuk, hogy a perineuronális mátrix kialakulása az emlősökhöz hasonlóan (Brückner és *mtsai*, 2000; Murakami és *mtsai*, 1997; Nakagawa és *mtsai*, 1987) az idegsejtek differenciálódásának idejétől függ.

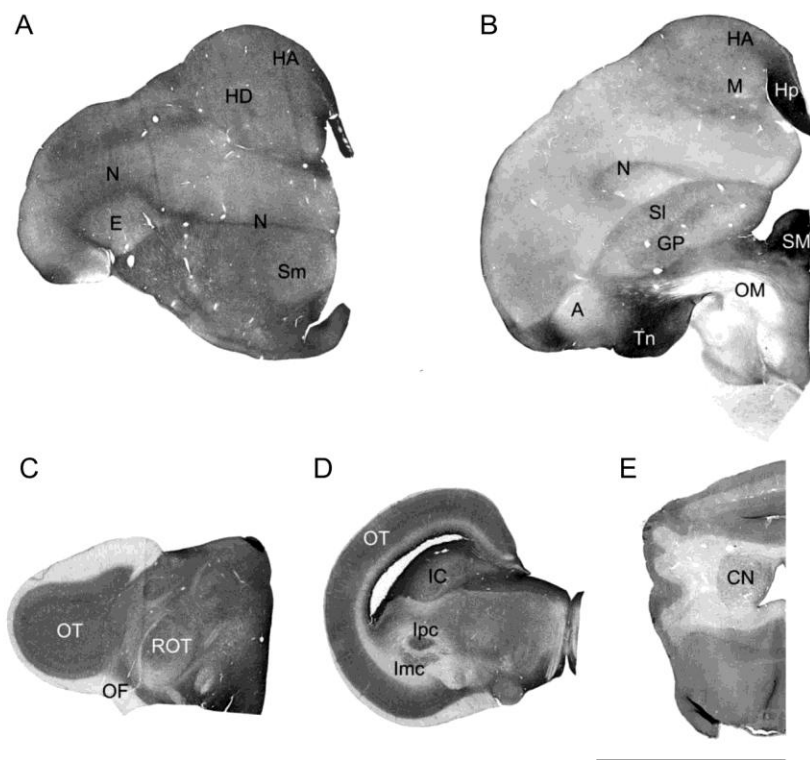
*A differenciált neuronokkal születő házi csirke agyában az idegsejtek és azok perineuronális mátrixa korai, párhuzamos fejlődést mutat*

Lektin- és immunhisztokémia vizsgálataink kimutatták, hogy az extracelluláris mátrix a tojást elhagyó egynapos csirkében már kimutatható, és a neuronok sejtteste körül jellegzetes fenotípussal, perineuronális hálóként kondenzálódott. A perineuronális hálókat HAA, SBA, VVA és SBA lektinreaktivitásuk (Härtig és *mtsai*, 1992), továbbá Cat-315<sup>+</sup> aggregán-immunreaktivitásuk alapján azonosítottuk (69. ábra). A Cat-315<sup>+</sup> aggregán tartalmú hálókat az agyvelő egész kranio-kaudális kiterjedésében megfigyelhettük már a kikelés utáni első napon (70. ábra). Az extracelluláris mátrix az emlősökben találtaktól eltérően (Brückner és *mtsai*, 1996) az idegsejtek sejtteste körül koncentrált, azok dendritjei és axon iniciális szegmentjei körül nem rakódott le (69. ábra). Szériametszeteinken végzett agytérképezési munkánk (brain mapping) alapján

megállapítottuk, hogy a kéthetes és három hónapos házi csirkék agyi régióiban az extracelluláris mátrix általános eloszlása nem változott, de az idegsejtek körül a perineuronális hálók kontrasztosabbá váltak, a homogénen kiterjedt mátrix állománytól jobban elkülönültek (69E-J ábra).



**69. ábra.** HAA<sup>+</sup> (A), SBA<sup>+</sup> (B,D) és VVA<sup>+</sup> (C) perineuronális hálók 13 napos házi csirke agyának isthmikus magjaiban és a tectum opticumban. Cat-315<sup>+</sup> perineuronális hálók 1 napos (E,F), 13 napos (G,H) és 3 hónapos (I,J) állatok telencephalonjában és isthmikus magjaiban. *Lépték:* 100  $\mu$ m (A-J).



F

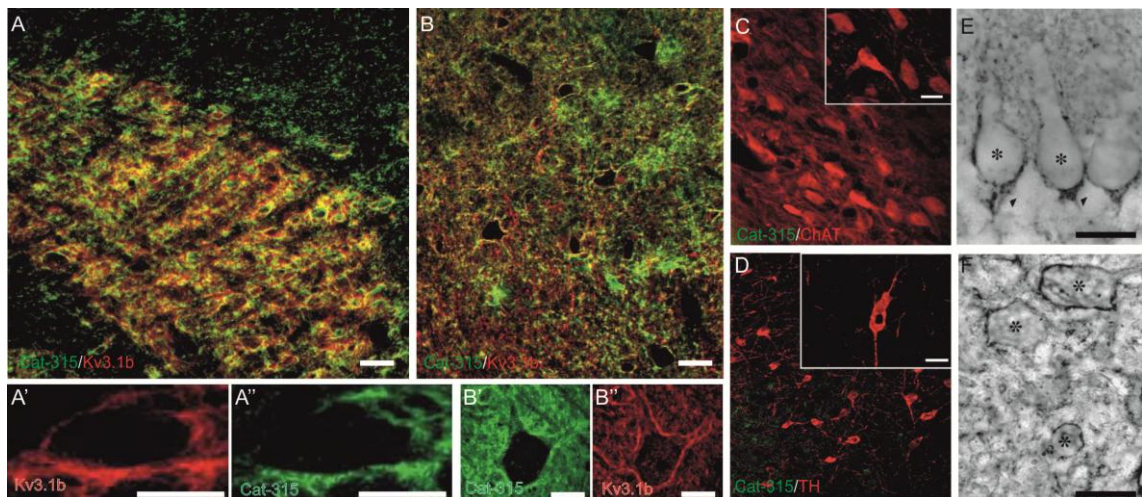
Régió	1 na pos	13 na pos	Felnőtt
<i>Telencephalon</i>			
Hyperpallium apicale (Hyperstriatum accessorium)	+++	+++	++++
Hyperpallium densocellulare (Hyperstriatum dorsale)	++	+++	+++
Mesopallium (Hyperstriatum ventrale)	+++	+++	++++
Nidopallium frontale (Neostriatum frontale)	++	++	+++
Nidopallium intermedium (Neostriatum intermedium)	+++	+++	++++
Nidopallium caudale (Neostriatum caudale)	+++	+++	++++
Striatum mediale (Lobus narolfactorius)	+++	+++	++++
Entopallium (Ectostriatum centrale)	+	+	++
Perientopallialis öv (Ectostriatum periphericum)	+++	+++	++++
Striatum laterale (Paleostriatum augmentatum)	+++	+++	++++
Globus pallidus (Paleostriatum primitivum)	+	+	++++
Arcopallium (Archistriatum)	++	++	+++
Hippocampus	++	++	++++
Nucleus septalis medialis	++	++	++++
Nucleus teniae	++	++	++++
<i>Köziagy</i>			
Nucleus rotundus (laterális része)	+++	+++	++++
Nucleus rotundus (mediális része)	++	++	+++
Nucleus triangularis	++	++	++
Nucleus dorsolaterális anterior (DLA)	++	++	+++
Nucleus dorsomedialis anterior (DMA)	++	++	+++
Nucleus dorsomedialis posterior (DMP)	+++	+++	+++
Nucleus geniculatus lateralis, pars ventralis (GLv)	+++	+++	+++
Nucleus geniculatus lateralis, pars dorsalis (GLd)	+++	+++	+++
<i>Középagy</i>			
Tectum opticum (minden réteg)	+++	+++	++++
Nucleus praetectalis	++	++	++++
Nucleus subpretectalis	+	++	++
Nucleus ovoidalis	+	++	++
A bazális opticus gyökér magja (nBOR)	++	++	++
Nucleus isthmi, pars magnocellularis (Imc)	+	+++	++
Nucleus isthmi, pars parvocellularis (Ipc)	+++	+++	++++
Nucleus ruber	+	+++	+++
<i>Cerebellum</i>			
Purkinie sejtek	++	+++	++++
Stratum moleculare (csak a diffúz mátrix festődött)	++++	++++	++++
Golgi sejtek	0	0	+
Kisagymagok	+	++	+++

A táblázatban alkalmazott nomenklátúra a 2004-es Avian Brain Nomenclature Forum-on meghatározott terminológiának felel meg. A mátrix jelölődésének intenzitását a következőképpen jeleztük: +++++, nagyon erős; +++, erős; ++, közepes; + gvenge; 0 nincs.

**70. ábra (az előző oldalon).** Kondroitin-szulfát proteoglikán tartalmú, Cat-315<sup>+</sup> perineuronális hálók eloszlása 13 napos házi csirke telenkefalonjában (A,B), köztiagyában (C), középagyában (C,D) és kisagyában (E). Az életkorral az eloszlási mintázat nem változik (F). *Rövidítések:* A arcopallium, CN kisagyagok, E entopallium, GP globus pallidus, HA hyperpallium apicale, HD hyperpallium densocellulare, Hp hippocampus, IC colliculus inferior, Imc nucleus isthmi, pars magnocellularis, Ipc nucleus isthmi, pars parvocellularis, M mesopallium, N nidopallium, OF optikus rostok, OM tractus occipitomesencephalicus, OT tectum opticum, ROT nucleus rotundus, SI striatum laterale, Sm nucleus septalis medialis, Tn nucleus taeniae. *Lépték:* 5 mm (A-E).

*A perineuronális hálók hasonló típusú idegsejtek körül fordulnak elő házi csirkében és emlősökben*

Több olyan idegsejt típus körül azonosítottunk perineuronális hálókat házi csirkében, melyek emlősökben jellegzetes képviselői a mátrixszal körülvett neuron populációnak. Így perineuronális hálókat találtunk a membránjukban Kv3.1b kálium csatornát tartalmazó gyorstüzelő neuronok körül (71A-B'' ábra), említésre méltóan olyan területen is – a nucleus isthmi magnocellularisban –, melynek emlősben nem tudunk analóg területet megfeleltetni. Ezzel ellentétben – és az emlősökben találtakhoz hasonlóan – nem találtunk Cat-315<sup>+</sup> aggregátum tartalmú perineuronális mátrixot ChAT<sup>+</sup> kolinerg és TH<sup>+</sup> monoaminerg idegsejtek körül (71C,D ábra). Az emlősökben jellegzetesen perineuronális hálóval bíró kisagyi Purkinje sejtek és kisagyi magok neuronjai (Carulli és *mtsai*, 2006; Mabuchi és *mtsai*, 2001) házi csirkében is hasonló mátrix fenotípust mutattak (71E,F ábra).



**71. ábra.** Cat-315<sup>+</sup> perineuronális hálók a membránjukban Kv3.1b-t kálium csatornát tartalmazó idegsejtek körül a nucleus isthmi pars magnocellularisban (A-B''). ChAT<sup>+</sup> (C) és TH<sup>+</sup> (D) neuronok körül nem találtunk Cat-315<sup>+</sup> mátrixot. Kisagyi Purkinje sejteket körülvevő Cat-315<sup>+</sup> perineuronális háló (E, a csillagok a sejtestest helyét mutatják, a nyílak a pinceau-ra mutatnak). Cat-315<sup>+</sup> perineuronális hálók a nucleus dentatus nagyméretű neuronjai körül (F, a csillagok a sejtestest helyét mutatják). *Lépték:* 20 μm (E,F), 10 μm (A-D).



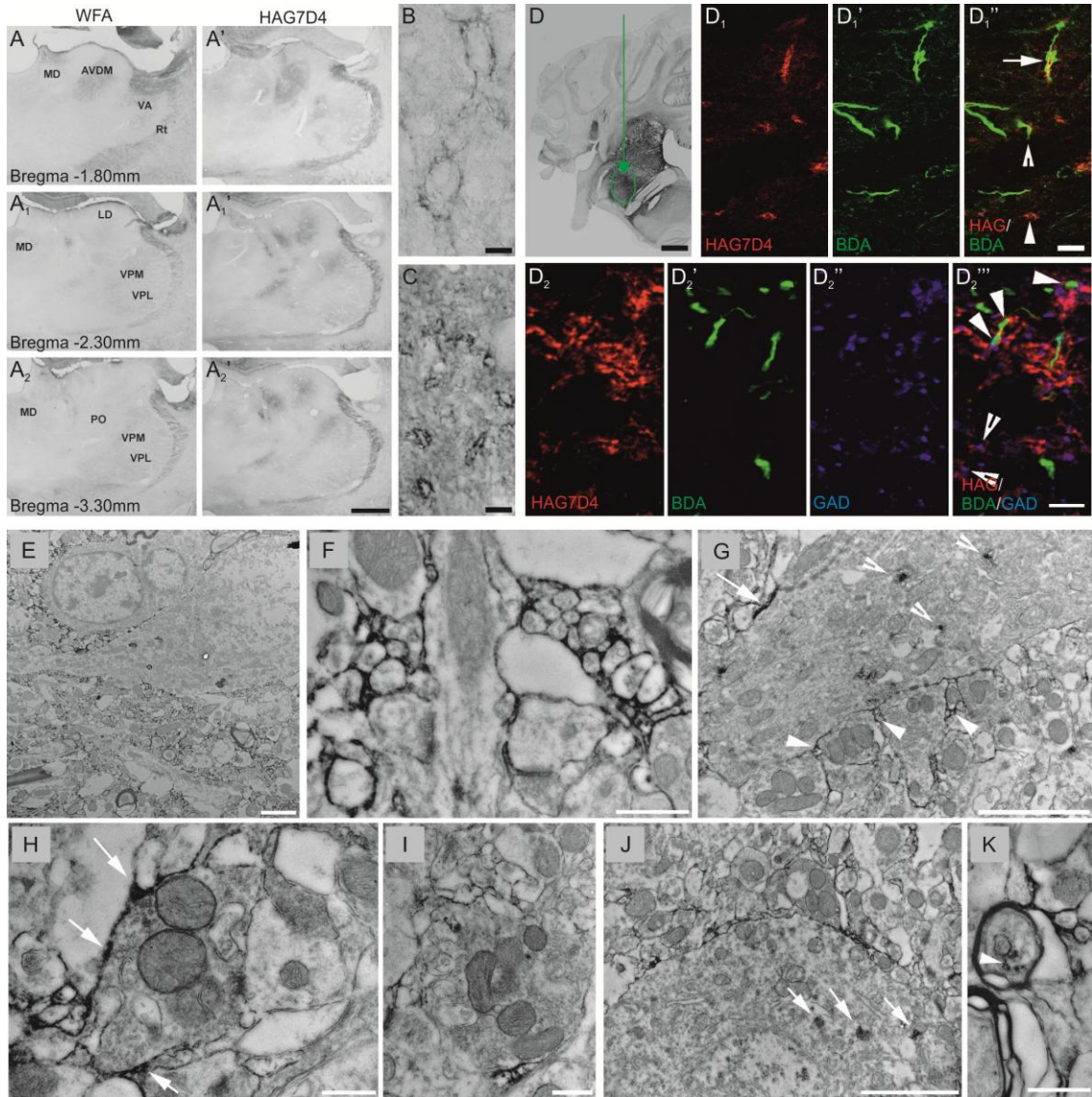
### ***A periszinaptikus mátrix izolált jelenléte és kémiai összetétele***

A központi idegrendszeri extracelluláris mátrixot a homogénen eloszló állományon kívül az idegsejtek sejtteste és proximális dendritjei körül található perineuronális hálóként azonosították. Munkáinkban rávilágítottunk, hogy ilyen periszomatodendritikus hálóktól függetlenül, izolált szinapszisok körül is létezhet jellegzetes kémiai összetételű mátrix aggregátum.

### ***Izolált periszinaptikus mátrixhüvelyek a talamuszban***

Patkány agyvelőben a talamusz magcsoportjaiban az extracelluláris mátrixot WFA-lektinhisztokémiával és aggregán-immunhisztokémiával is feltérképeztük, melyek azonos mintázatot mutattak (72A-A<sub>2</sub>' ábra). A retikuláris talamusz magban igen erős mátrixfestést találtunk, amit a perineuronális hálók nagy száma és sűrű elhelyezkedése okozott. Ezzel ellentétben, a specifikus magokban a mátrix lektin- és immunreaktivitása gyenge volt, perineuronális hálókat csak kis számban találtunk (72B ábra). Azonosítottunk ugyanakkor kis, 2-4 µm méretű, ovoid alakú vagy kerek gracilis mátrix profilokat (72C ábra), legnagyobb számban a ventrális érző- (nuclei ventralis anterior et lateralis) és motoros (nucleus ventralis posterolateralis et posteromedialis) talamuszmagokban. Ezek a képletek önállóan, gyöngysorszerűen felsorakozva, vagy csokrokat alkotva tűntek fel a talamuszmagokban. *In vivo* anterográd pályakövetéssel kombinált immunhisztokémiával izolált periszinaptikus mátrixot mutattunk ki trigeminális afferensek végződése körül (72D-D<sub>1</sub>' ábra), valamint hasonlóan – és még gyakrabban - GAD<sup>+</sup> gátló szinapszisok közvetlen környezetében is (72D<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>' ábra).

Elektronmikroszkópos vizsgálódásaink (72E-K ábra) megerősítették a fény- és konfokális lézer szkennig mikroszkóppal tett megfigyeléseinket. Mátrix lerakódást többféle neuronális kompartment mentén találtunk, legnagyobb számban preterminális axonszakaszok (72F ábra) és axodendritikus szinapszisok (72G,H ábra), ritkábban nagyméretű specifikus afferensek (72I ábra) és a sejttest körül is (72J ábra). Az axonszakaszok és axo-dendritikus junctionok körüli mátrix struktúrákat magyarul a periaxonális hüvely elnevezéssel illettük. Megfigyeléseinket az intracelluláris térre is kiterjesztettük: mind a dendritek (72G ábra), mind a sejttest citoplazmájában (72J ábra), de mielinhüvellyel körülvett axolemmában is (72K ábra) kimutattunk aggregán-immunoreaktivitást.



**72. ábra.** WFA<sup>+</sup> (A-A<sub>2</sub>) és HAG7D4<sup>+</sup> (A'-A<sub>2</sub>') extracelluláris mátrix eloszlása patkány talamuszában. Perineuronális hálókat (B) - a nucleus reticularis thalamit kivéve – csak elvétve találtunk, 2-4 µm méretű ovális profilokat (C) ugyanakkor nagy számban azonosítottunk. A nucleus sensorius principalis n. V.-ből (D, zöld nyíl és kör) anterográdfeltöltött terminálisok (D-D<sub>1</sub>'', nyíl, a nyílhegy anterográdfeltöltött bouton nem körülvevő, a hasított nyílhegy mátrixszal körül nem vett jelölt boutonra mutat), és főként valamint GAD<sup>+</sup> terminálisok körül (D<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>'', hasított nyílhegy, a nyílhegyek anterográdfeltöltött végződésekre mutatnak) izolált HAG7D4<sup>+</sup> mátrixaggregátumokat azonosítottunk. A nucleus ventralis posteromedialis ultrastruktúráját vizsgálva (E) HAG7D4<sup>+</sup> mátrixot találtunk preterminalis axonszakaszok körül (F), dendritekben (G, hasított nyílhegyek) és axodendritikus junkciók (H, nyílak; G, nyílhegyek), ritkán a nagyméretű specifikus afferensek körül (I). HAG7D4-immunoreaktivitást sejtestben (J, nyílak) és mielinhüvelyes axonban (K, nyílhegy) is azonosítottunk. *Lépték:* 1mm (D), 500 µm (A-A<sub>2</sub>'), 3 µm (B,C,D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>''), 2 µm (E,G,J), 500nm (F,H,I,K).

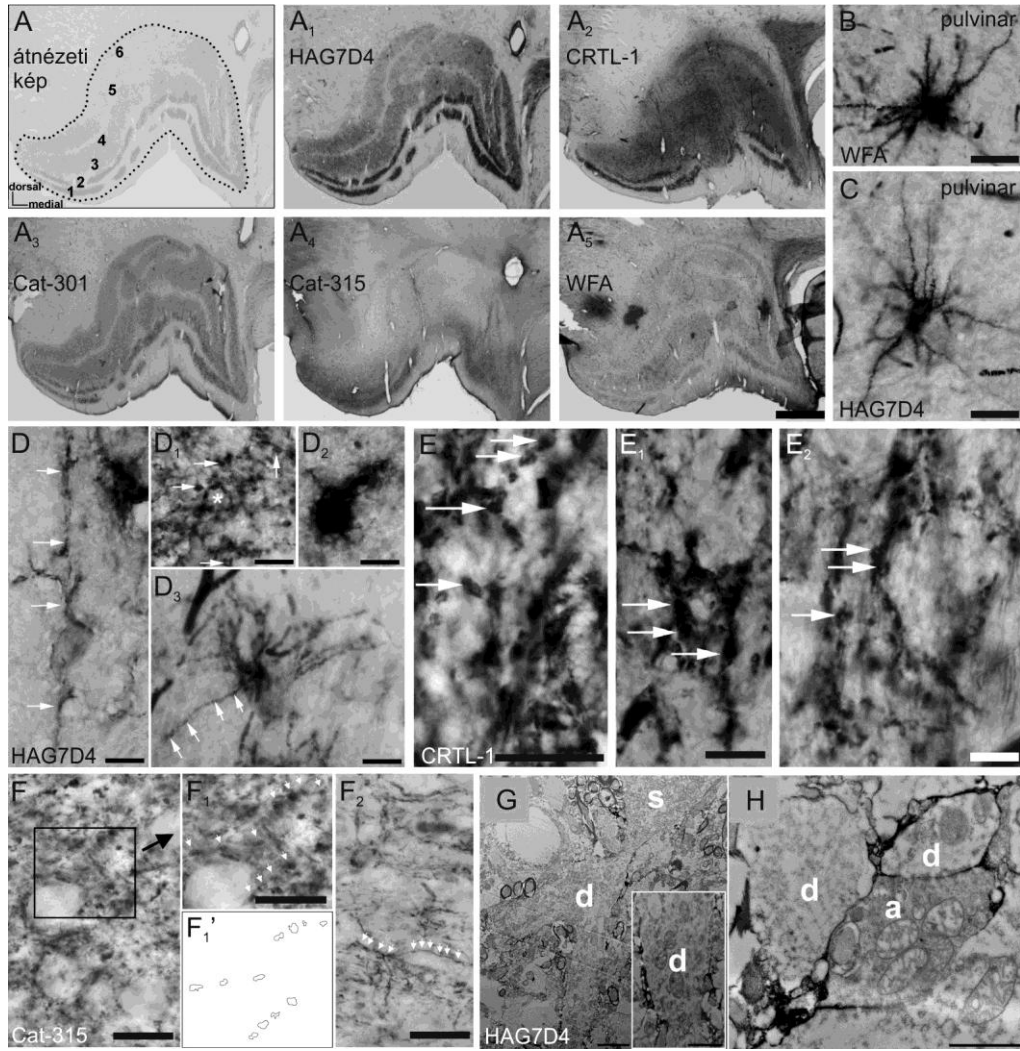
***Az extracelluláris mátrix szélsőségesen periszinaptikus rendeződési formája az ember köztiagyának külső térdtestében***

A corpus geniculatum laterale extracelluláris mátrixának szerveződését az aggregán tengelyfehérje és kapcsolófehérjéjének (a CRTL-1 „link” fehérjének)

immunhisztokémiai megjelenítésén keresztül ismertük meg (73A-A<sub>5</sub> ábra). Lektinhisztokémiával az extracelluláris mátrixot láthatóvá tenni nem tudtuk; WFA<sup>+</sup> perineuronális hálót találtunk ugyanazon metszeteken a pulvinar thalamiban (73B ábra), a külső térdestestben azonban nem. Aggregátum tartalmú perineuronális hálót - szemben a pulvinar thalamiban megfigyelttel (73C ábra) - a corpus geniculatum lateraleban ugyancsak nem találtunk, a neuronok körvonala számos esetben mégis kirajzolódott (73D,D<sub>1</sub>,D<sub>3</sub> ábra). A magnocelluláris (1. és 2.) rétegek sokkal intenzívebb mátrix festődést mutattak, mint a parvocelluláris (3-6.) rétegek (73A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub> ábra). A patkány talamuszmagjaiban azonosított struktúrákhoz hasonló képleteket, HAG7D4<sup>+</sup>, CRTL-1<sup>+</sup> és Cat315<sup>+</sup> periaxonális hüvelyeket azonosítottunk 10-40 µm hosszú láncokban felsorakozva, melyek dendrit körvonalát, ritkábban a sejtet körülvevő utóbbit rajzolták ki (73D,D<sub>1</sub>,D<sub>3</sub>,E-F<sub>2</sub> ábra). A parvocelluláris rétegekben a Cat315<sup>+</sup> profilok feltűnően gracilis, lapos fűzészerű képleteket alkottak (73F<sub>2</sub> ábra).

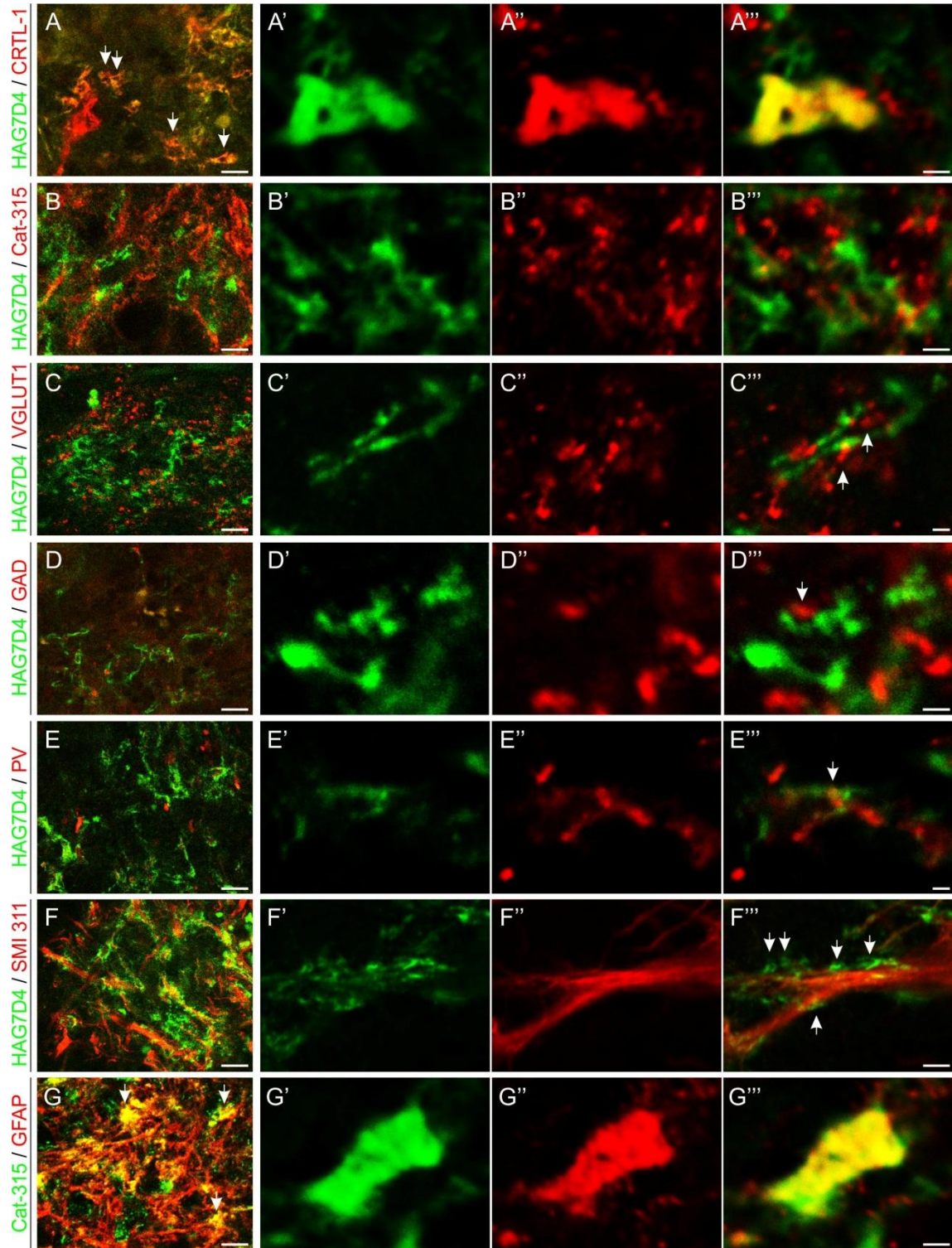
Az axodendritikus kapcsolat (szinapszis) tényleges azonosítására elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Kimutattuk, hogy a dendrit mentén elhelyezkedő kisméretű mátrix-immunreaktív profilok valóban szinapszisokat vesznek körül, míg összefüggő mátrixborítást - perineuronális hálót - a sejttesten nem találtunk (73G,H ábra).



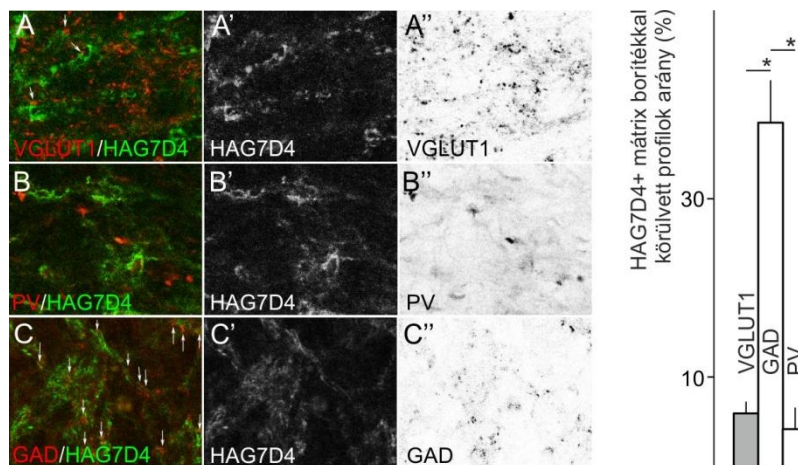


**73. ábra.** A corpus geniculatum laterale áttekintő képe, lektinhisztokémiai és immunhisztokémiai reakciókkal (A-A<sub>5</sub>). WFA<sup>+</sup> (B) és HAG7D4<sup>+</sup> (C) perineuronális hálók a pulvinar thalamiban. A corpus geniculatum lateraleban perineuronális hálót elvéve, intralaminárisan (D<sub>2</sub>) találtunk, a neuronok körvonalát HAG7D4<sup>+</sup> (D, D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub>, G, H), CRTL-1<sup>+</sup> (E-E<sub>2</sub>) és Cat315<sup>+</sup> (F-F<sub>2</sub>) periaxonális hüvelyek (nyílak és nyílhegyek D, D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub>, E-E<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> ábrákon) rajzolták ki. Rövidítések: a axon, d dendrit, s sejttest. Lépték: 1mm (A-A<sub>5</sub>), 10 µm (B-F<sub>2</sub>), 2 µm (B), 1 µm (G, nagyított beillesztett kép), 500nm (H).

Szinaptikus markerekkel történt többszörös jelöléseink kimutatták, hogy a SMI-311<sup>+</sup> dendritek (Colombo és *mtsai*, 1998) mentén (74F-F'') előforduló HAG7D4<sup>+</sup> periaxonális hüvelyek mind VGLUT1<sup>+</sup> serkentő, mind GAD<sup>+</sup> és parvalbumin<sup>+</sup> gátló végződések körül előfordulnak (74C-E'''ábra). A HAG7D4<sup>+</sup> struktúrák CRTL-1-immunoreaktívok voltak (74A-A'''), de legtöbb esetben Cat-315-immunonegatívak maradtak (74B-B'''). Cat-315<sup>+</sup> struktúrák ugyanakkor GFAP-immunoreaktivitást mutathattak (74G-G'''). Megállapítottuk, hogy előfordulásuk arányában a GAD<sup>+</sup> végződések körül jóval gyakrabban (38%) fordultak elő periaxonális hüvelyek, mint VGLUT1<sup>+</sup> (4%) vagy parvalbumin<sup>+</sup> (6%) profilok körül (75. ábra).



**74. ábra.** A HAG7D4<sup>+</sup> extracelluláris mátrix CRTL-1-immunopozitivitást (**A-A'''**), ugyanakkor Cat-315-immunonegativitást mutatott (**B-B'''**). HAG7D4<sup>+</sup> periaxonális hüvelyek VGLUT1<sup>+</sup> (**C-C'''**), GAD<sup>+</sup> (**D-D'''**) és parvalbumin<sup>+</sup> (**E-E'''**) profilokat, vélhetően terminálisokat vettek körül. Periaxonális hüvelyek SMI-311 dendritek mentén (**F-F'''**, *nyílak*). Cat-315<sup>+</sup> struktúrák több esetben GFAP-immunoreaktivitást mutattak (**G-G'''**). *Lépték:* 10  $\mu$ m (**A-G**), 5  $\mu$ m (**F-F'''**), 1  $\mu$ m (**A'-E'''**).



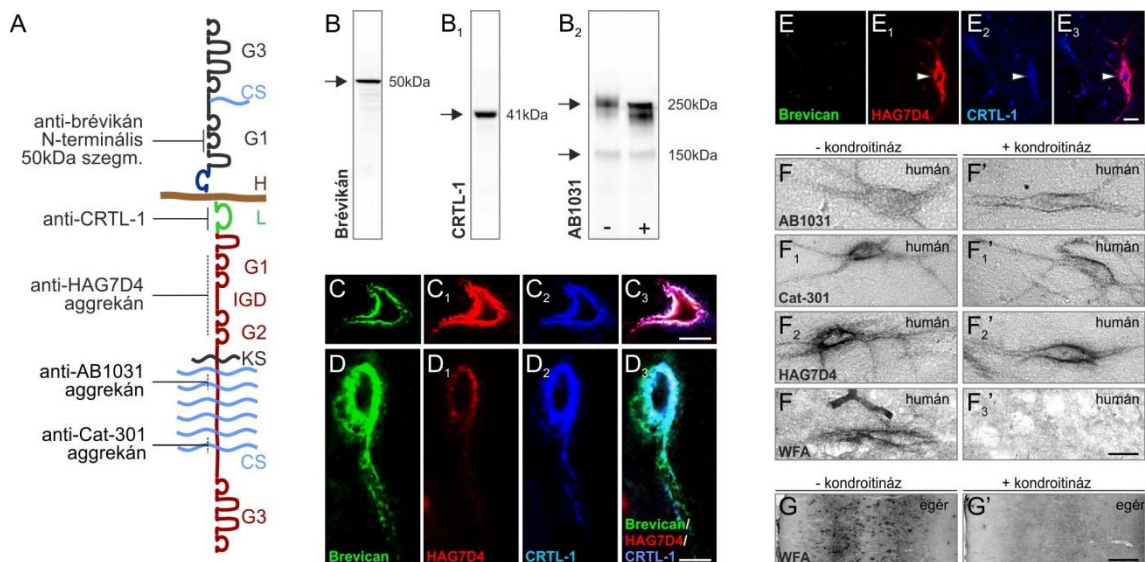
**75. ábra.** HAG7D4<sup>+</sup> periaxonális hüvelyeket (nyílhegyek az **A,B,C** ábrákon) VGLUT1<sup>+</sup> (**A-A''**), parvalbumin<sup>+</sup> (**B-B''**), leggyakrabban GAD<sup>+</sup> (**C-C''**, **D**) profilok körül azonosítottunk. *Lépték: 3 µm (A-C'').*

### **Az extracelluláris mátrix perineuronális eloszlása az ember hippocampusában**

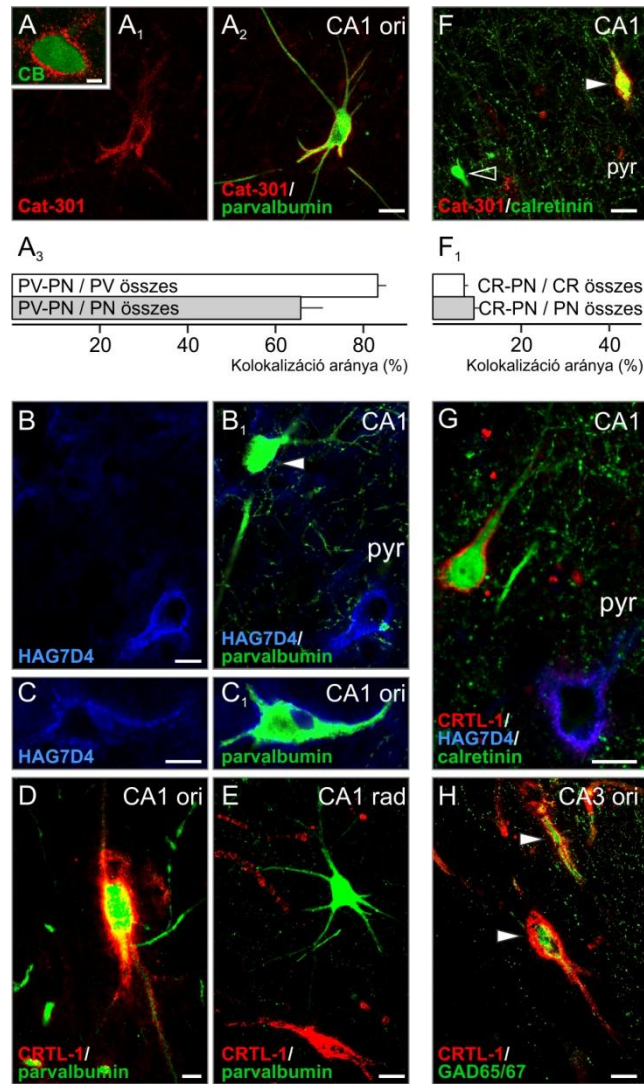
Az Alzheimer- kór folyamán az allokortikális struktúrák, így a hippocampusz korán és jelentősen károsodnak (Palop és Mucke, 2009). Arra kerestük a választ, milyen szerepet játszik az extracelluláris mátrix, különösen annak izolált periszinaptikus formája a neurodegeneratív folyamatban. Ehhez meghatároztuk a kondroitin-szulfát proteoglikán alapú perineuronális mátrix eloszlási térképét a hippocampuszban, kompartmentalizációtól függő kémiai heterogenitását, majd ezek ismeretében kutattuk annak Alzheimer-kórban beálló változását.

Vizsgálatainkhoz aggregán-, brévikán- és a CRTL-1 kapcsolófehérje ellenes antitesteket alkalmaztuk, melyeket humán mintáinkon validáltunk (76A-B<sub>1</sub> ábra). A korábban, általunk is vizsgált állatfajokban találtakkal összhangban az ember hippocampuszában is azonosítottunk perineuronális hálókat (76C-F<sub>3</sub> ábra), melyek főként parvalbumin<sup>+</sup>, de mindeddig nem ismert módon calretinin<sup>+</sup> és calbindin<sup>+</sup> interneuronok körül is előfordultak (77. ábra). Periaxonális hüvelyeket is azonosítottunk, melyek jellegzetes regionális eloszlást, és a pre- és posztzinaptikus részek körül kémiai heterogenitást mutattak.





**76. ábra.** A használt antitestek epitóp felismerési helyei (**A**, a  *folyamatos vonalak* az ismert, a  *szaggatott vonalak* a vélt felismerési helyeket jelzik). Western blottal igazoltuk a brévikan (**B**), a CRTL-1 fehérje (**B<sub>1</sub>**) és az AB1031 antitesttel detektált aggregán (**B<sub>2</sub>**) jelenlétét humán hipokampális mintáinkon. A perineuronális hálók CRTL-1- és HAG7D4-immunoreaktivitást mutatnak (**C-E<sub>3</sub>**), a brévikan nem állandó komponense a struktúrának (**E-E<sub>3</sub>**). Humán *post mortem* mintáinkban a kondroitináz kezelés nem változtatta meg az aggregán tartalmú perineuronális hálók fenotípusát (**F-F<sub>2</sub>'**), de a WFA jelölés teljes eltűnéséhez vezetett (**F<sub>3</sub>-G'**). Rövidítések: **CS** kondroitin-szulfát oldalláncok, **G1/G2** N-terminális globuláris domének, **G3** C-terminális globuláris domén, **IGD** interglobuláris domén, **KS** keratán-szulfát oldallánc, **L** CRTL-1 kapcsolófehérje. Lépték: 100  $\mu$ m (**G,G'**), 10  $\mu$ m (**C<sub>3</sub>,E<sub>3</sub>, F-F<sub>3</sub>'**), 5  $\mu$ m (**D<sub>3</sub>**).



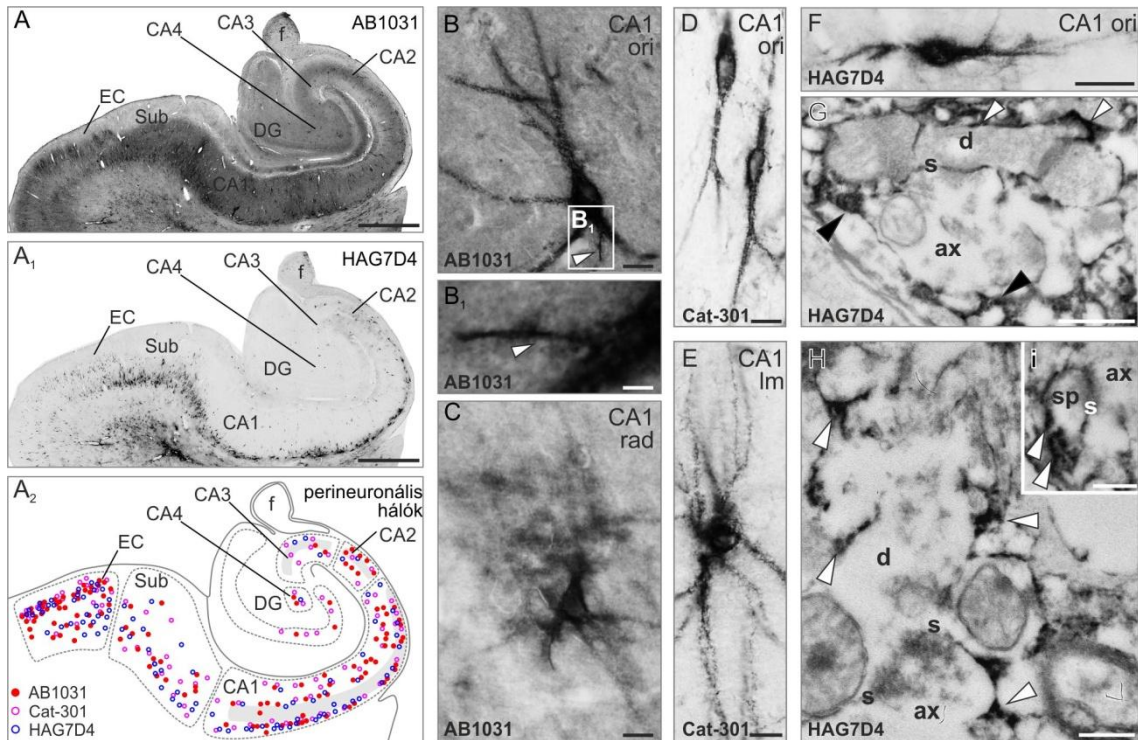
**77. ábra.** Az ember hippocampusában talált aggregán tartalmú perineuronális hálók calbindin<sup>+</sup> (A), leggyakrabban parvalbumin<sup>+</sup> (A<sub>1</sub>-E) és calretinin<sup>+</sup> interneuronok (F-G; a *nyílhegy* az F ábrán perineuronális hálóval körülvett, az *üres nyílhegy* perineuronális hálóval nem körülvett calretinin<sup>+</sup> interneuronra mutat) körül is előfordulnak. A parvalbumin-immunoreaktivitás és a perineuronális hálók kolokalizációs gyakorisága sokkal magasabb parvalbumin<sup>+</sup> (A<sub>3</sub>), mint calretinin<sup>+</sup> (F<sub>1</sub>) sejtek körül, perineuronális háló nélküli parvalbumin<sup>+</sup> interneuront mindazonáltal több esetben is azonosítottunk (*nyílhegy* a B<sub>1</sub> ábrán, E). CRTL-1<sup>+</sup> perineuronális háló GAD65/67<sup>+</sup> interneuron körül (H, *nyílhegyek*). Átlag ± standard hiba, \**p* < 0,05 (A<sub>3</sub>, F<sub>1</sub>). Lépték: 10 µm (A<sub>1</sub>-H), 2 µm (A).

### **A posztoszintaktikus oldali mátrix megjelenési formája és összetétele**

*Az aggregán alapú mátrix perineuronális hálókat jelöl és posztoszintaktikus struktúrák körül kondenzálódik*

Az aggregán molekula kondroitin-szulfátban gazdag régióját (AB1031 és Cat-301) vagy N-terminálisát (HAG7D4) felismerő antitestek alkalmazásával megállapítottuk, hogy perineuronális hálók az ember hippocampusának valamennyi rétegében előfordulnak, de piramissejteket nem jelölnek (78A-A<sub>2</sub> ábra). Legsűrűbben a CA1 régió

stratum oriensében, de a stratum radiatumban és lacunosum-moleculareban is nagy számban azonosítottunk perineuronális hálókat (78A<sub>2</sub> ábra). Az entorhinalis kérget a strata principales élénk immunoreaktivitása alapján tudtuk megbízhatóan azonosítani (78A ábra). Fenotípusát tekintve találkozunk éles kontúrú „klasszikus” (78B ábra), de diffúz (78C ábra) típusú (Wegner és *mtsai*, 2003) perineuronális hálókkal is, melyek a dendriteket akár 50  $\mu$ m hosszan is kísérték (78B-F ábra). Perineuronális hálókat jellegzetesen parvalbumin<sup>+</sup> sejtek körül találtunk (77A-E ábra), de – ellentétben az eddig vizsgált fajokkal tapasztaltakkal (Brückner és *mtsai*, 1996; Härtig és *mtsai*, 1994) – az ember hippocampusának calretinin<sup>+</sup> interneuronjainak egy részét is periszomatikus mátrix borította (77F,F<sub>1</sub>,G ábra). Elektronmikroszkópos vizsgálataink (78G-I ábra) rávilágítottak, hogy az aggregán tartalmú extracelluláris mátrix a szinaptikus kapcsolatoknak jellegzetesen a posztszinaptikus oldalán halmozódott fel, dendritek és dendrittüskék körül (78H,I ábra), más esetben az egész szinapsztis tokszerűen körülölelte (78G ábra).



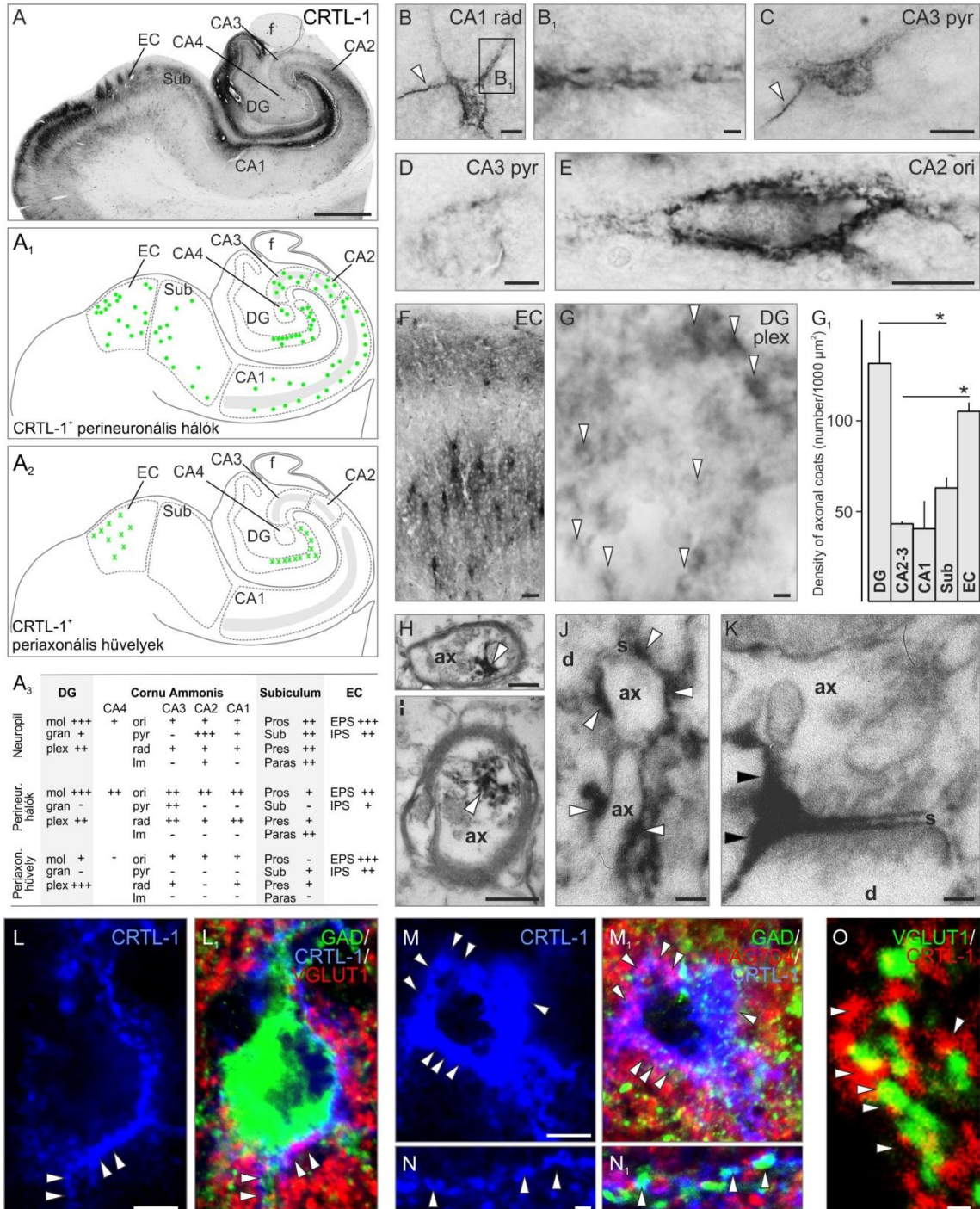
**78. ábra.** AB1031<sup>+</sup> (A), HAG7D4<sup>+</sup> (A<sub>1</sub>) és Cat-301<sup>+</sup> aggregán tartalmú perineuronális hálók eloszlási térképe (A-A<sub>2</sub>) az ember hippocampusában. A „klasszikus” erős kontúrú hálók mellett (B,D,E,F) diffúz típusú (C) perineuronális hálókat is azonosítottunk a hippocampus különböző rétegeiben. Axon iniciális szegmensét körülvevő AB1031<sup>+</sup> mátrix (B<sub>1</sub>). Aggregán tartalmú HAG7D4<sup>+</sup> mátrix posztszinaptikus dendritszakaszokon (G,H, *nyílhegyek*) és dendrittüskék körül (I, *nyílhegyek*) jelent meg. *Rövidítések:* ax axon, CA1-4 cornu Ammonis régiók, d dendrit, DG gyrus dentatus, EC entorhinalis kéreg, f fimbria hippocampi, Im stratum lacunosum moleculare, ori stratum oriens, rad stratum radiatum, s szinapszis, Sub subiculum, sp dendrittüske. *Lépték:* 500  $\mu$ m (A,A<sub>1</sub>), 10  $\mu$ m (B-F), 4  $\mu$ m (B<sub>1</sub>), 500 nm (G), 250 nm (B-F).

***A preszinaptikus oldali mátrix megjelenési formája és összetétele***

*A CRTL-1<sup>+</sup> struktúrák izolált periaxonális hüvelyként jelentkeztek serkentő és gátló szinapszisok körül*

CRTL-1<sup>+</sup> perineuronális hálókat kisebb sűrűségben, de az aggregán<sup>+</sup> perineuronális hálókhoz hasonló eloszlásban azonosítottunk az hippocampusban (79A-E ábra). Az aggregán-immunfestésekkel ellentétben ugyanakkor nagy számban találtunk periaxonális hüvelyeket, kiemelten sűrűn a gyrus dentatusban és az entorhinalis kéregben (79A-A<sub>3</sub>, F-G<sub>1</sub> ábra). Ultrastrukturális elemzéseink kimutatták, hogy a CRTL-1<sup>+</sup> extracelluláris mátrix mielinhüvelyes axonokon axolemmájában (79H,I ábra), még jellegzetesebben a szinapszisok köré tömörülve (79J,K ábra) fordult elő. Nagy felbontású konfokális lézer-szkenning mikroszkópia segítségével megállapítottuk, hogy a legproximálisabb inter-neuronális kapcsolatokat hordozó sejttest és a disztálisabb szinapszisokat kapó dendritok perineuronális mátrix állományba vannak beágyazva (79L-N<sub>1</sub> ábra), míg a gyrus dentatus hiláris régiójában sűrűn találtunk izolált periszinaptikus mátrixot VGLUT1<sup>+</sup> serkentő szinapszisok körül (79O ábra).



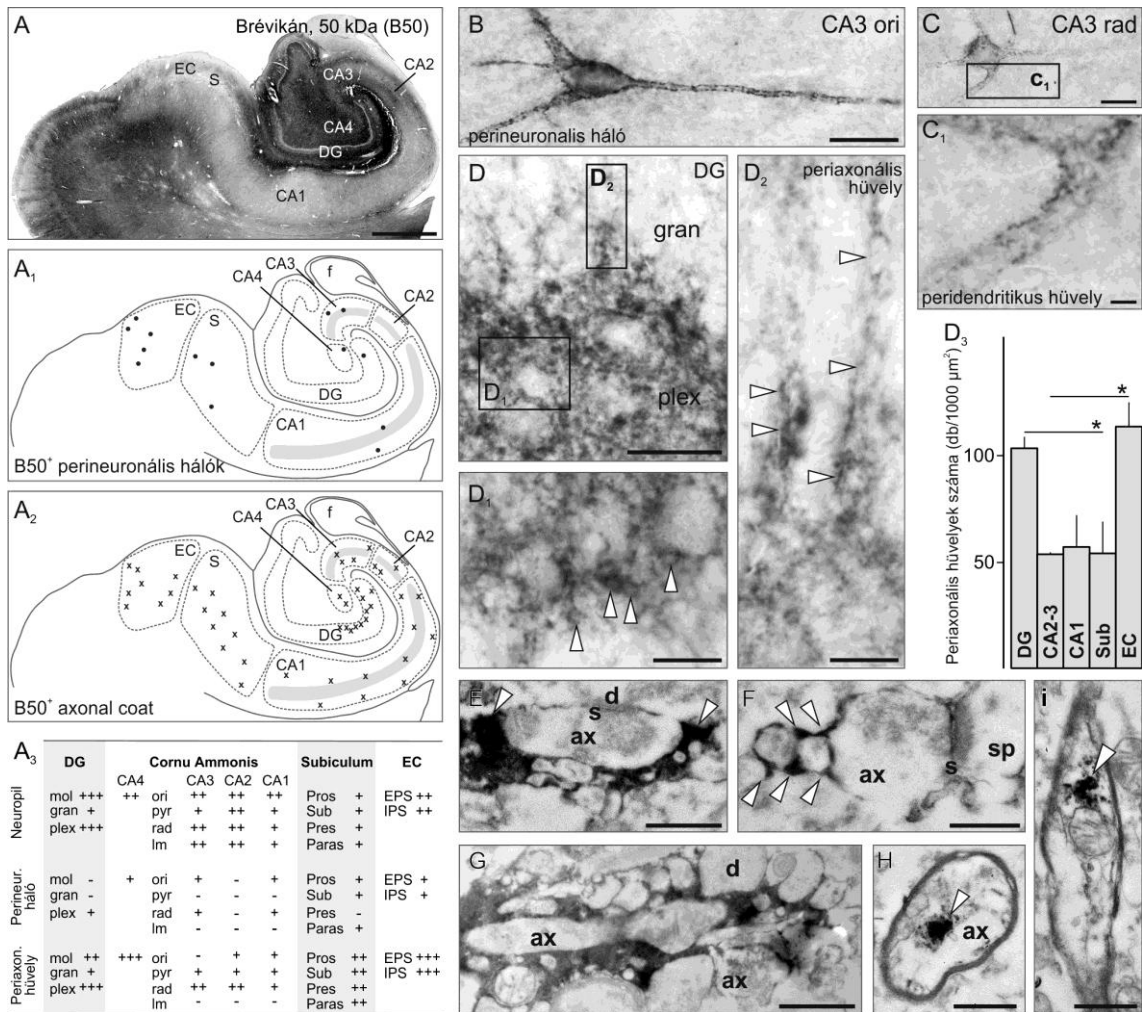


**79. ábra.** CRTL-1-immunoreaktivitás (A), CRTL-1<sup>+</sup> perineuronális hálók (A<sub>1</sub>) és periaxonális hüvelyek (A<sub>2</sub>) eloszlási térképe és gyakorisága (A<sub>3</sub>) a hippocampusz formáció különböző területein. CRTL-1<sup>+</sup> perineuronális hálók (B) és peridendritikus hüvelyek (B<sub>1</sub>) a stratum radiatumban, a stratum pyramidaleban (C,D) és oriensben (E). Periaxonális hüvelyek, (F,G, *nyílhegyek*) legnagyobb gyakorisággal az entorinális kéregben (F,G<sub>1</sub>) és a gyrus dentatusban (G, *nyílhegyek*, G<sub>1</sub>) fordultak elő. CRTL-1-immunoreaktivitás mielinhüvelyes axonban (H,I, *nyílhegyek*), terminális axonszakasz (J, *nyílhegyek*) és axodendritikus junkció (K, *nyílhegyek*) körül. GAD<sup>+</sup> és VGLUT1<sup>+</sup> végződészek CRTL-1<sup>+</sup> perineuronális hálókba ágyazva (L,L<sub>1</sub>, *nyílhegyek*). GAD<sup>+</sup> profilok HAG7D4<sup>+</sup>/CRTL-1<sup>+</sup> diffúz típusú perineuronális hálókba (M,M<sub>1</sub>, *nyílhegyek*) és peridendritikus hüvelybe (N,N<sub>1</sub>, *nyílhegyek*) ágyazva. CRTL-1<sup>+</sup> periaxonális mátrix VGLUT1<sup>+</sup> terminális körül (O, *nyílhegyek*). Átlag ± standard hiba, \**p* < 0,05 (G<sub>1</sub>). *Rövidítések:* ax axon, CA1-4 cornu Ammonis régiók, d dendrit, DG gyrus dentatus, EC entorinális kéreg, EPS stratum principale externum, f fimbria hippocampi, gran stratum granulosum, IPS stratum principale internum, mol stratum moleculare, ori stratum oriens, Paras parasubiculum, plex stratum plexiforme, Pres presubiculum, Pros prosubiculum, pyr stratum pyramidale, rad stratum radiatum, s szinapszis, Sub subiculum. Lépték: 500 μm (A), 20 μm (F), 10 μm (B,C,L,L<sub>1</sub>,M,M<sub>1</sub>), 5 μm (D,E), 2 μm (B<sub>1</sub>,G,N,N<sub>1</sub>,O), 250 nm (I), 100 nm (H,J,K).



A brévikan alapú mátrix a preszinaptikus oldalon halmozódik, összefüggő perineuronális hálókat az emberi hippocampusban csak ritkán alkot

Brévikan<sup>+</sup> perineuronális hálókat csak elvétve találtunk a CA1-CA4 régiók stratum radiatumában és stratum oriensében (80A-C<sub>1</sub> ábra). Ezzel szemben izoláltan, vagy láncszemszerűen felsorakozva találtunk a CRTL-1-immunhisztokémia térképéhez hasonló morfológiájú és eloszlású kis, kerek mátrix profilokat, kiemelkedő számban a gyrus dentatusban és az entorhinalis kéregben (80A,A<sub>1</sub>,A<sub>3</sub>,D-D<sub>3</sub> ábra).

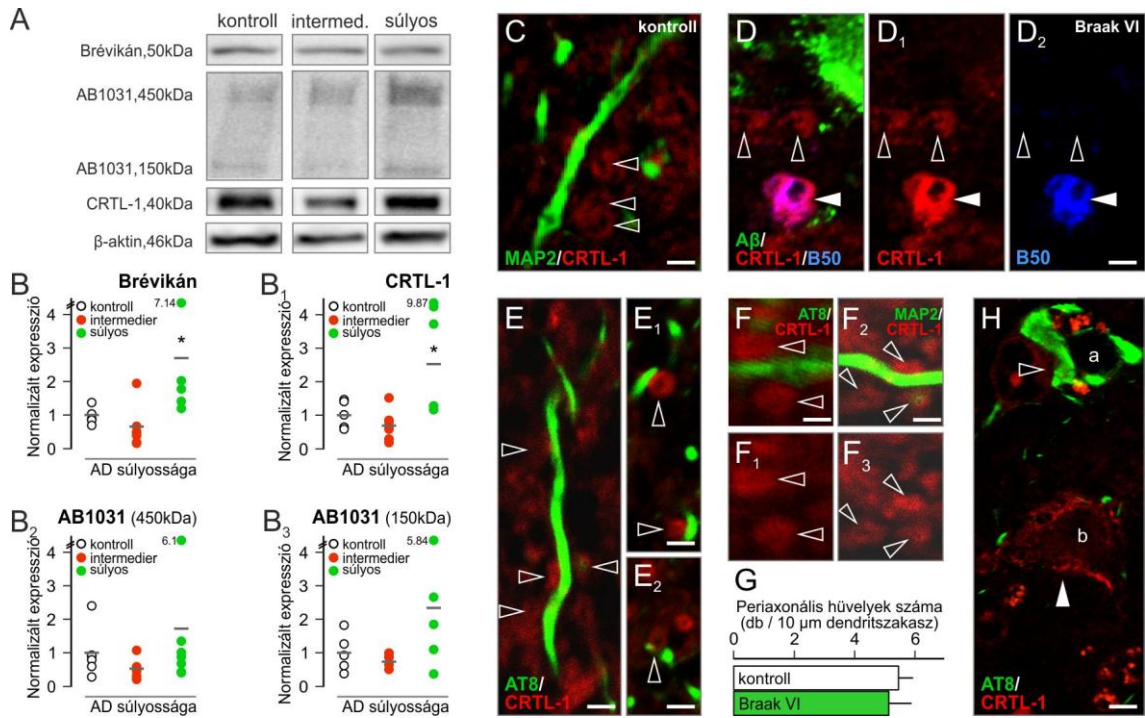


**80. ábra.** Brévikan-immunoreaktivitás (A), brévikan<sup>+</sup> perineuronális hálók (A<sub>1</sub>) és periaxonális hüvelyek (A<sub>2</sub>) eloszlási térképe és gyakorisága (A<sub>3</sub>) a hippocampus formáció különböző területein. Brévikan<sup>+</sup> perineuronális hálóval (B,C) és peridendritikus hüvellyel (C<sub>1</sub>) ritkán találkozunk, periaxonális hüvelyeket (D, D<sub>1</sub> és D<sub>2</sub>, nyílhegyek) azonban nagy számban azonosítottunk, legnagyobb sűrűségben a gyrus dentatusban és az entorhinalis kéregben (D<sub>3</sub>). Brévikan<sup>+</sup> mátrixot a preszinaptikus oldalon (E, nyílhegyek), axon preterminális szakasza körül (F, nyílhegyek, G) és mielinhüvelyes axonokban (H,I, nyílhegyek) azonosítottunk. Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$  (D<sub>3</sub>). Rövidítések: ax axon, CA1-4 cornu Ammonis régiók, d dendrit, DG gyrus dentatus, EC entorhinalis kéreg, EPS stratum principale externum, f fimbria hippocampi, gran stratum granulosum, IPS stratum principale internum, mol stratum moleculare, ori stratum oriens, Paras parasubiculum, plex stratum plexiforme, Pres presubiculum, Pros prosubiculum, rad stratum radiatum, s szinapszis, sp dendrittüske, Sub subiculum. Lépték: 500  $\mu$ m (A), 10  $\mu$ m (B,C), 5  $\mu$ m (D), 4  $\mu$ m (C,D<sub>1</sub>,D<sub>2</sub>), 500 nm (I), 250 nm (E-H).

Elektronmikroszkópos elemzésünk rávilágított, hogy a brévikan<sup>+</sup> extracelluláris mátrix a szinapszisok preszinaptikus oldalára korlátozódik, a poszt-szinaptikus struktúrákra nem terjed ki, összefüggő mátrixburkot neuronális kompartmentek körül kiterjedten nem alkot (80E-G ábra). Az intracelluláris terek közül mielinhüvelyes axonok axolemmájában találtunk brévikan-immunoreaktivitást (80H,I ábra).

### ***Az extracelluláris mátrix változásai Alzheimer-kórban***

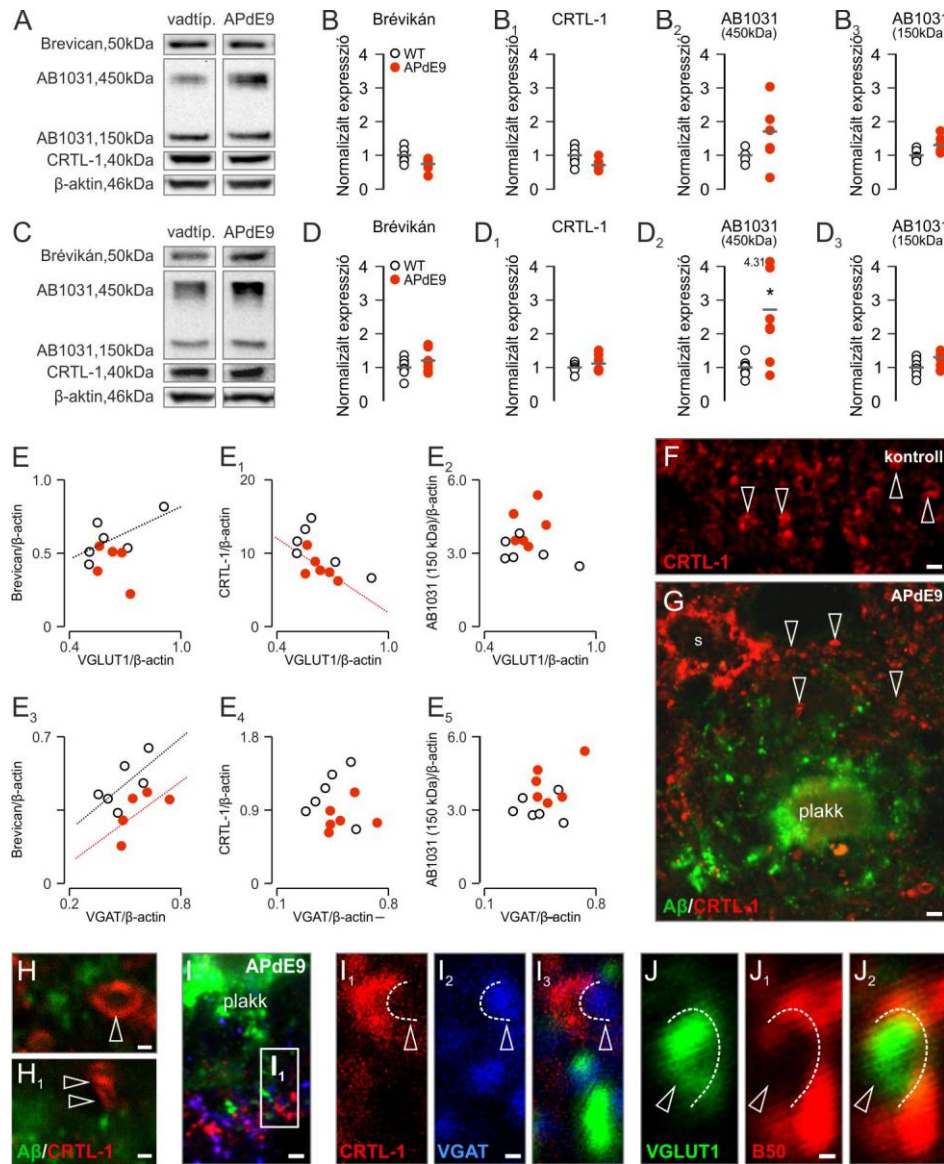
Különböző stádiumú (Braak 0/1 – Braak 2/4 – Braak 5/6) Alzheimer-kórban elhunyt betegekből, valamint hasonló korú, Alzheimer-kórban nem szenvedő idősekből nyert mintákon kimutattuk (2. táblázat), hogy az aggregán, a CRTL-1 kapcsolófehérje és a brévikan expressziója a betegség korai/intermedier stádiumában mérsékelten csökken, majd a kór végső stádiumában megemelkedik (81A-B<sub>3</sub> ábra). A változásokat strukturális vizsgálatoknak vetettük alá. Arra kerestük a választ, hogy az Alzheimer-kórra jellemző hisztopatológiai elváltozások, így extracelluláris  $\beta$ -amiloid plakkok és intracelluláris hiperfoszforilált tau lerakódások közelében megváltozik-e a kondroitinszulfát-proteoglikán alapú mátrix előfordulása vagy megjelenési formája. CRTL-1<sup>+</sup> periaxonális hüvelyek amiloid béta plakkok közelében változatlanul előfordultak (81C-D<sub>2</sub> ábra). Mennyiségi analízissel bizonyítottuk, hogy periaxonális hüvelyek Braak 5/6 stádiumú szövetekben azonos sűrűségben fordulnak elő a hiperfoszforilált tau fehérjét jelölő AT8<sup>+</sup> dendritek mentén (81F<sub>2</sub>,F<sub>3</sub>,G ábra), mint kontroll mintákban MAP2<sup>+</sup> dendritek mentén (81E-F<sub>1</sub>,G ábra). Az extracelluláris mátrix másik jellegzetes megjelenési formáját, a perineuronális hálókat vizsgálva megállapítottuk, hogy azok AT8<sup>+</sup> sejtestek körül nem fordulnak elő, a CRTL-1- és AT8-immunohisztokémiai jelölés komplementer eloszlást mutatott (81H ábra).



**81. ábra.** Brévikán, aggregán (AB1031) és CRTL-1 fehérje detektációja Western blotting módszerrel kontroll és Alzheimer-kórban elhunytak hippocampális mintáiban (**A**). A betegség előrehaladott stádiumában a brévikán és a CRTL-1 fehérje szintje megemelkedett (**B**, **B<sub>1</sub>**), az aggregán fehérje esetén statisztikailag szignifikáns változást nem tudtunk kimutatni (**B<sub>2</sub>**, **B<sub>3</sub>**). CRTL-1<sup>+</sup> periaxonális hüvelyek MAP-2<sup>+</sup> dendrit mentén kontroll mintában (**C**, *nyílhegyek*). CRTL-1<sup>+</sup>/brévikán<sup>+</sup> periaxonális hüvelyek A $\beta$  plakkok közvetlen közelében Braak VI stádiumú mintákban (**D-D<sub>2</sub>**, *nyílhegyek*). CRTL-1<sup>+</sup> periaxonális hüvelyek AT8<sup>+</sup> dendritek mentén (**E-E<sub>2</sub>**, *nyílhegyek*, **F-F<sub>1</sub>**, *nyílhegyek*), melyek sűrűsége nem különbözik (**G**) a kontroll mintákban MAP2<sup>+</sup> dendritek mentén azonosított periaxonális hüvelyek (**F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub>**, *nyílhegyek*) sűrűségétől. CRTL-1<sup>+</sup> perineuronális hálót AT8<sup>+</sup> sejtek körül (b) azonosítottunk, AT8<sup>+</sup> sejttestek körül (a) nem (**H**, a *nyílhegy* a perineuronális hálóra mutat). Átlag  $\pm$  standard hiba,  $p > 0,05$  (**G**). *Lépték:* 2  $\mu$ m (**C-D<sub>2</sub>**, **H**), 1,5  $\mu$ m (**E-F<sub>2</sub>**).

### **A fehérje expresszió és a mátrixstruktúra változásai az APdE9 transzgenikus Alzheimer-kór egérmódelben**

A humán mintákon végzett biokémiai vizsgálatokat az Alzheimer-kór patológiai történéseit modellező APdE9 egértörzsben is elvégeztük (82. ábra). Hét- és tízhónapos állatokat vizsgálva úgy találtuk, hogy a CRTL-1 és brévikán fehérjék szintje először csökken, majd emelkedik, míg az aggregán fehérje expressziója folyamatos emelkedést mutat (82A-D<sub>3</sub> ábra). Vad típusú állatokban pozitív korrelációt találtunk a brévikán és a VGLUT1 fehérje szintjei között. Transzgenikus mintáinkon ez az összefüggés eltűnt, ugyanakkor a brévikán és VGAT fehérjék korrelációja fennmaradt, bár alacsonyabb értékeken (82E-F<sub>2</sub> ábra). Jóllehet a használt egérmódel – hasonlóan bármilyen más egérmódelhez – nem alkalmas az Alzheimer-kór teljes patomechanizmusának leképezésére, az egér- és humán mintákon talált változások hasonlóságai szembeszökőek.



**82. ábra.** Brévikan, aggregán (AB1031) és CRTL-1 fehérje detektációja Western blotting módszerrel 7 hónapos (A-B<sub>3</sub>) és tíz hónapos (C-D<sub>3</sub>) APdE9 transzgenikus egerek hipokampuszában. Tíz hónapos állatban az aggregán fehérje szintje a transzgenikus állatokban a vad típusúakhoz képest megemelkedik (D<sub>2</sub>). Szemben a CRTL-1 és az aggregán (AB1031) expresszióval, a brévikan proteoglikán szintje pozitívan korrelál a VGLUT1 mennyiségével vad típusú állatokban, ami a transzgenikus állatokban megváltozik (E-E<sub>2</sub>). A brévikan szintje genotípustól függetlenül korrelált a VGAT expressziós szintjétől, transzgenikus állatokban ugyanazon VGAT értékhez nagyobb brévikan expressziós érték tartozott (E<sub>3</sub>-E<sub>5</sub>). Periaxonális hüvelyek (F, *nyílhegyek*) Aβ<sup>+</sup> plakkok közvetlen közelében is előfordulnak (G-H<sub>1</sub>, *nyílhegyek*), melyek VGAT<sup>+</sup> (I-I<sub>3</sub>, *nyílhegyek*) és VGLUT1<sup>+</sup> (J-J<sub>2</sub>, *nyílhegyek*) profilokat fogtak körül. Átlag ± standard hiba, \**p* < 0,05 (B-B<sub>3</sub>, D-D<sub>3</sub>). Lépték: 4 μm (F,G), 2 μm (I), 1,5 μm (H,H<sub>1</sub>,I<sub>1</sub>-I<sub>3</sub>,J-J<sub>2</sub>).

A mátrix mintázatát jellemző morfológiai eredményeink szintén hasonlóságot mutattak a humán szövetben találtakkal, periaxonális hüvelyeket nagy sűrűségben találtunk extracelluláris β-amiloid plakkok közvetlen közelében (82F-I). Ez az eredmény mindazonáltal nem zárja ki, hogy egy elpusztult, funkcióját veszített szinapszist zárna

körül egy fennmaradt mátrixstruktúra. Ennek tisztázására többszörös immunhisztokémiai jelölést végeztünk, és megállapítottuk, hogy a CRTL-1<sup>+</sup> és brévikán<sup>+</sup> izolált periszinaptikus hüvelyek VGLUT1<sup>+</sup> és VGAT<sup>+</sup> pozitív profilokat vesznek körül, melyek neurotranszmitter leadására alkalmas szinapszisok jelenlétére utalnak (82J-K<sub>2</sub> ábra).

## 5. Megbeszélés

Munkámban az idegsejtek és szinapszisainak Alzheimer-kórban fellépő funkcionális-anatómiai, proliferációs és plasztikus képességeinek változásait vizsgáltam transzgenikus egértörzsekben és más emlős kísérletes állatmodelleken, valamint humán mintákon. Kísérleteimmel a betegség két fő patobiokémiai és patohisztológiai jelensége, a kóros amiloid metabolizmus és tau fehérje foszforiláció hatását céloztam jobban megérteni. Megállapítottam, hogy az amiloid lerakódáshoz vezető vagy ahhoz nem vezető amiloid prékurzor fehérje expressziója eltérő, sok tekintetben ellentétes funkcionális anatómiai változásokat vált ki a kérgi neuronok szerkezetében és inter-neuronális kapcsolataiban. Az Alzheimer-kór korai stádiumában fellépő citoszkéletális elváltozásokat téli álmodó emlősökben, és a növekedési faktorok szignál transzdukciójában kulcsfontosságú p21H-ras fehérje expresszió hatásainak leírásával vizsgáltam. Bizonyítottam, hogy a kóros neurofibrillum képződés kompartment-specifikus velejárója a szinaptikus regresszióknak, míg a citoszkéletális elváltozásokért felelős p21H-ras fehérje expressziója koordinált neuronális és szinaptikus növekedést vált ki a differenciált idegrendszerben. Az endokannabinoidok vizsgálata során a lebontó metabolizmus és a neuron-glia interakció lehetséges megváltozását mutattam ki Alzheimer-kórban. Plasztikus neurokémiai jegyeket mutató neuronokat és azok szelektív károsodását azonosítottam elsőként Alzheimer-kórban az ember tractus olfactoriusában, mely a betegségben tapasztalt szaglás zavarokban bírhat jelentőséggel. A periszinaptikus régióval kapcsolatos vizsgálataimmal rámutattam az extracelluláris mátrix egyedi szerveződésére és a neurodegeneratív betegségben betöltött szinaptoprotektív szerepére.

### 5.1. Az amiloid prékurzor fehérje neuromorfogenezisben és sejtgyűjtésben megfigyelt aspektusai

Az amiloid prékurzor fehérjét és annak fragmenseit az amiloidogén metabolizmus, legfőképp az A $\beta$  fragmens hatásainak tükrében vizsgálják. Kísérleteinkben különböző szintű, humán és mutáns, amiloidogén és nem amiloidogén expressziós hatásokat elemeztünk. Ezekkel a kísérletekkel törekedtünk az amiloid prékurzor molekula élettani és patológiai metabolizmusának hatásait az agykéregben a neuronok modellezése segítségével nyomon követni.

#### *Fiziológiai humán amiloid prékurzor molekula expresszió a piramisneuronok morfogenezisének tükrében. Neuroprotektív aspektusok*

Az amiloid lerakódásban fellelhető proteinek az amiloid prékurzor fehérje megváltozott metabolizmusának termékei. A prékurzor molekula önmagában

ugyanakkor számos fiziológias sejtbiológiai funkcióban tölt be szerepet (P. R. Turner és *mtsai*, 2003). Első kérdéskörünkben azt kívántuk vizsgálni, hogyan befolyásolja a humán amiloid prékurzor fehérje fiziológias szintű expressziója a neuronális növekedést. A kommisszurális piramissejtek különösen érzékenyek az Alzheimer-kórban történő változásokra (Hof és *mtsai*, 1995). Ez a tény, valamint homogén dendritikus mintázatuk (Duan és *mtsai*, 2002; Soloway és *mtsai*, 2002) indított minket arra, hogy az egész sejtre kiterjedő térbeli rekonstrukcióhoz ezt az idegsejt populációt válasszuk a transzgenikus fehérje expresszió okozta változások nyomon követésére. A B6-Py8.9 egértörzs ideális vizsgálati alannak bizonyult, mert a transzgenikus humán fehérjét az endogénhez hasonló – tehát fiziológias – szinten expresszálta. Feltételezzük, hogy a transzgenikus fehérje fiziológias metabolizmus útján fejtette ki hatását, mert agymintáinkban az endogén molekulához hasonlóan mind membránhoz kötött, mind szolubilis formában azonosítottuk, melyek mindkét formájukban egyaránt trofikus hatásúak (Qiu és *mtsai*, 1995). A vizsgált egértörzs egyedeiben Alzheimer-kórra jellemző hisztopatológiai elváltozások nem találhatók (Lamb és *mtsai*, 1993), így a dendritfában fellépő morfológiai, és a kéregben talált inter-neuronális kapcsolatokat jellemző változásokat nagy biztonsággal a transzgenikus humán amiloid prékurzor fehérje és annak fiziológiasan keletkező fragmensei okozta hatásoknak tulajdoníthatjuk.

A piramissejtek dendritfájának proximális és középső részében a dendritszegmensek elágazódóbbak lettek, megrövidültek, átmérőjük ugyanakkor növekedett, mely a bazális dendritek esetében azok felszínének növekedéséhez vezetett. A dendritikus felszín nagysága a szinaptikus kapcsolatok számával szigorú korrelációt mutat (Colonnier, 1968; Feldman, 1975; M. L. Feldman és Dowd, 1975; Muller és *mtsai*, 1984). Feltételezzük, hogy a humán amiloid prékurzor protein fiziológias szintű expressziója a dendritfa alakját úgy módosítja, hogy új szinaptikus kapcsolatok kiépülését segítse elő. A változások abban a dendritikus régióban történtek, ahol a szignálcsökkenés kisebb mérvű a disztális kompartmentekhez képest (P. Anderson és *mtsai*, 1987; Henze és *mtsai*, 1996). A dendritfa elágazódási mintázatának változása összecseng azon tanulmányokkal, melyek amiloid prékurzor fehérje deficiens állatokban csökkent dendritikus arborizációt és szinaptikus plaszticitást állapítottak meg (Seabrook és *mtsai*, 1999). *In vitro* vizsgálatok a prékurzor fehérje axon kinövésben és elongációban betöltött szerepét hangsúlyozzák (Ohsawa és *mtsai*, 1997; Salinero és *mtsai*, 2000; Small és *mtsai*, 1994). Míg a dendritszegmensek számának szaporodása ezekkel az eredményekkel összhangban állhat, az általunk megfigyelt dendritfa- és szegmens rövidülés az *in vivo* hatások eltérőségére hívja fel a figyelmet.



A szinapszis szám növelésének előmozdítására nemcsak a dendritfelszín növekedése, hanem a neuromodulátor hatású, permisszív katekolaminerg végződések számának növekedése is utal. Növekedést tapasztaltunk ezen kívül a piramissejtek kommisszurális axonjain az *en passant* boutonjainak számában, melyből arra következtetünk, hogy a humán amiloid prékurzor molekula expressziója növeli a principális sejtek efferens, kommisszurális kapcsolatainak számát.

A prékurzor fehérje expressziójának hatásait degenerációs és stimulációs körülmények között is megvizsgáltuk (utóbbit a következő alfejezet taglalja). A dendritek morfológiája nagyban meghatározza és tükrözi vissza az idegsejtet elérő afferens információk számát és jellegét. A bejövő ingerületeknek nem passzív továbbítói, ellenkezőleg, azok dinamikus integrátor struktúráinak tekintjük őket (Hausser és *mtsai*, 2000). Már korai tanulmányok kimutatták, hogy az idegsejtek dendritfáinak alakja feltűnően megváltozik, ha afferenseiktől megfosztjuk őket, vagy ellenkezőleg, ha új primer afferensekkel gazdagodnak (Feng és Rogowski, 1980; Valverde, 1971).

Deprivációs kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a humán amiloid prékurzor fehérje csökkenti vagy megakadályozza a bajuszszerű eltávolítás okozta dendrit degenerációt. Vad típusú állatokban mind az apikális-, mind a bazális dendritfa szegmensei jelentősen zsugorodtak, amit elsősorban az átmérők csökkenése okozott. A B6-Py8.9 transzgenikus egerekben az apikális dendritfa oldalfácskáinak morfológiája a vad típusúval szemben ugyanakkor nem mutatott degeneratív jelenségeket, miként a bazális dendritfa összesített hossza sem csökkent. Ezen morfológiai változások állhatnak a prékurzor fehérje azon protektív, a kritikus sérülési periódust áthidalni segítő hatásai mögött, melyekre korábbi ischaemiás és toxikus károsodást vizsgáló tanulmányok is felhívták már a figyelmet (Masliah és *mtsai*, 1998; Smith-Swintosky és *mtsai*, 1994).

### ***A nem amiloidogén humán amiloid prékurzor fehérje expresszió hatásai a fizikai aktivitás előidézte dendritogenezisben***

Az önkéntes fizikai aktivitás (Nithianantharajah és Hannan, 2006; Stranahan és *mtsai*, 2007), az ingergazdag környezet (Bindu és *mtsai*, 2007; Faherty és *mtsai*, 2003; Leggio és *mtsai*, 2005; Workman és *mtsai*, 2009) plasztikus változásokat indít el a központi idegrendszer neuronjaiban, mely azok morfológiájában, működésében, végül az állat kognitív képességeiben is visszatükröződik. A kognitív képességek és az amiloid prékurzor fehérje metabolizmusa nem független egymástól. Ingergazdag környezetben a neuronális aktivitás megváltozása csökkenti az A $\beta$  szintet és az amiloid

lerakódást, mérsékli utóbbiak kognitív képességek rontó hatásait (Bimonte és *mtsai*, 2002; Costa és *mtsai*, 2007; Lazarov és *mtsai*, 2005; Wolf és *mtsai*, 2006).

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a humán amiloid prékurzor fehérje expressziója hogyan befolyásolja az önkéntes fizikai aktivitás pozitív központi idegrendszeri hatásai mögött meghúzódó neuromorfológiai változásokat. Kísérleteinkhez olyan egértörzset (PDGF-hAPP<sub>wt</sub>) választottunk, melyben a transzgenikus fehérje expressziójának szintje az endogénnek közel kétszerese. Az állatokban az A $\beta$  fehérje szintje a vad típusúakban mérttel összehasonlítva nem különbözött, így amiloidózist sem találtunk.

Normál állatházi körülmények között a dendritfa és a dendritszakaszok morfológiai változásai a B6-Py8.9 és PDGF-hPP<sub>wt</sub> egerekben gyakorlatilag megegyeztek, utóbbi állatok hippocampális piramissejtjein még kifejezettebbek lettek. Az endogén prékurzor fehérje szintjéhez képest megegyező vagy kétszeres mennyiségű humán amiloid prékurzor molekula expresszió a bazális dendritekben okozott szegmenssűrűség- és átmérő növekedést. Nem változott PDGF-hPP<sub>wt</sub> egerekben a dendrittüskék sűrűsége sem, mely a megnövekedett dendritfelszín tükrében ugyanakkor a dendrittüskék abszolút számának növekedésére utal. A humán prékurzor molekula expressziója ugyanakkor nem növelte tovább (nem potenciózta) azt a dendritikus átmérő- és következményes felszínnövekedést, melyet a vad típusú egerekben is megfigyelhettünk. Annak ellenére, hogy vad típusú állatokban a dendritikus növekedés több paramétert tekintve kifejezettebb volt, korábbi tanulmányokkal szemben (Snyder és *mtsai*, 2005; Ting és *mtsai*, 2007) nem gondoljuk, hogy ez a transzgenikus expresszió gátló hatása lett volna. Feltevésünket erősíti, hogy a dendrittüskék sűrűségének vad típusúakban is megfigyelt növekedését a humán amiloid prékurzor molekula jelentősen fokozta. A hippocampális piramissejtek vélhetően megnövekedett szinapszisszám és -sűrűsége korábbi viselkedéstani vizsgálatok eredményeit tükrözi vissza, melyek amiloid prékurzor proteint expresszáló transzgenikus állatokban megnövekedett kognitív, így tájékozódási és felderítési képességekről számoltak be (Senechal és *mtsai*, 2008).

A magas prékurzor fehérje expresszió következményeit a legtöbb tanulmány a megemelkedett A $\beta$  fragmens szint következményeként vizsgálta, ennek megfelelően neurodegeneratív, a kognitív képességek csökkenéséhez vezető idegéletani és szinaptomorfológiai változásokat állapítottak meg (Kamenetz és *mtsai*, 2003; Lanz és *mtsai*, 2003; Matsuyama és *mtsai*, 2007; Mucke és *mtsai*, 2000; Snyder és *mtsai*, 2005). Kísérleteinkkel rámutattunk, hogy - amennyiben ez nem jár az A $\beta$  szint

növekedésével - az emelkedett szintű amiloid prékurzor fehérje expresszió, a vizsgált neuromorfológiai aspektusokat tekintve, önmagában trofikus hatású.

***Dendritikus változások az amiloidogén mutáns amiloid prékurzor fehérje hatásai tükrében. Fokozott degeneráció afferens depriváció esetén***

Az amiloid lerakódás és az ahhoz vezető magas A $\beta$  szint idegsejtekre tett hatásáról bőséges irodalom született az elmúlt évtizedekben (Knowles és *mtsai*, 1998; Knowles és *mtsai*, 1999). A neuromorfológiai tanulmányok az amiloid plakkokban, illetve azok közelében található dendritnyúlványok változásaira összpontosítottak, kóros görbületeket és tágulatokat mutató dendritekről illetve axonokról számoltak be (Le és *mtsai*, 2001; Tsai és *mtsai*, 2004). A fokális aberrációk mellett a dendritfa egészének vizsgálata ugyanakkor nem történt meg, következő feladatunkat ennek feltérképezésében jelöltük meg. A kísérletekhez választott 9 hónapos Tg2576 törzsű egerek már bőséges, az Alzheimer-kórhoz hasonló jellegű amiloid lerakódást mutatnak az agykéregben (Hsiao és *mtsai*, 1996; Terai és *mtsai*, 2001). Ebben az egértörzsben csupán fokális dendritikus és axon degenerációról számoltak be (Le és *mtsai*, 2001), hasonlóan egy másik egértörzshöz, melynek egyedei a mutáns amiloid prékurzor protein mellett presinilin 1-t is (APP/PS1 egerek) expresszálnak (Terai és *mtsai*, 2001). A neuronok működését fokális változások tükrében megítélni azonban nehéz, arra az egész dendritfára kiterjedő jellemzés alkalmas (Hausser és *mtsai*, 2000).

Megállapítottuk, hogy az amiloid plakkok képződésével járó magas A $\beta$  szint a bazális dendritfa egészében, szegmenseiben és arborizációs mintázatában sem okoz változásokat. Az apikális dendritfa ugyanakkor megrövidül, szegmenseinek átmérője növekszik, mely a dendritikus felszínben változást nem okoz. A rétegspecifikus afferens információk integrációja az apikális dendritfán történik (Mountcastle, 1997; Schaefer és *mtsai*, 2003), így annak morfológiai változása jelentős funkcionális következménnyel jár (Froemke és *mtsai*, 2005; LaBerge, 2005, 2006). Az afferensek tényleges számának, a dendritek integratív kapacitásának fontos fokmérője ugyanakkor a dendrittüskék sűrűsége (Jacobs és *mtsai*, 2001), melynek csökkenése az Alzheimer-kór egyik jellegzetes pathohisztológiai jele (Masliah, 1995). A dendrittüskéken található a serkentő szinapszisok igen nagy hányada, a betegségben itt halmozódik fel először az A $\beta$  fragmens (Mattson, 1994, 1997; Selkoe, 2008a), mely azok pusztulásához vezet. Mind a bazális, mind az apikális dendritfán jelentősen csökkent a dendrittüskék száma, mely az állatban leírt romló kognitív képességek strukturális hátterét jelentheti (Hsiao és *mtsai*, 1996). A szinapszisok számának radikális csökkenését tapasztalták egy olyan állattörzsben is, mely a mutáns amiloid prékurzor fehérje mellett presinilin 1-t is expresszál (Moolman és *mtsai*, 2004).

Feltételezzük, hogy a Tg2576 állatokban megfigyelt változásokért a mutáns prékurzor molekula felelős, mely az endogén fehérjével kompetálva és magas A $\beta$  szintet kialakítva (Hsiao és *mtsai*, 1996) károsítja a szinaptikus struktúrákat.

A mutáns amiloid prékurzor fehérjének és metabolitjainak degeneratív hatását bizonyítják azok az eredmények is, melyeket deprivációs kísérleteinkkel a B6-Py8.9 és Tg2576 törzsű egerekben nyertünk. A szimultán végzett bajuszszőr eltávolítás után előző fajban neuroprotektív hatást észleltünk (lásd előbb), míg utóbbiban a vad típusú állatokban talált dendrit degeneráció radikálisan súlyosbodott. A szegmenseknek nem csupán az átmérőjük, hanem hosszuk is csökkent, mely különösen az apikális dendritfán váltott ki szembeszökő változást, ahol a dendritikus felszín a különböző szegmenseken felére, több esetben harmadára csökkent. Az apikális dendritfa ilyen mértékű változása a sejt integratív képességének végzetes beszűkülésére utal (LaBerge, 2005, 2006).

***A humán amiloid prékurzor fehérje sejtproliferációra és differenciálódásra tett hatásai a hippocampusban***

A mutáns prékurzor fehérje, az amiloidogenezis és az ahhoz vezető magas A $\beta$  fehérje szint sejtproliferatív hatásairól több, ellentmondásos tanulmány született (Ermini és *mtsai*, 2008), melyek felölelik a gátlótól (Haughey és *mtsai*, 2002) a semleges hatáson (Verret és *mtsai*, 2007) keresztül a proproliferatív (Jin és *mtsai*, 2004) aspektusokat. Megközelítésünk ezekhez a tanulmányokhoz képest eltért: munkánkban a vad típusú, nem amiloidogén humán amiloid prékurzor fehérje expresszió hatásait vizsgáltuk.

A sejtszaporulattal kapcsolatos megfigyeléseinket a felnőtt agyvelő egyik fő neurogenikus területének tekintett hippocampus gyrus dentatusában tettük. Normál állatházi körülmények között a prékurzor fehérje expressziója csökkentette az újonnan született sejtek számát. Ez összhangban áll azon tanulmányok eredményeivel, melyek amiloid prékurzor fehérje génkiütött (APP KO) egerekben megnövekedett sejtszaporulatról számolnak be (Ma és *mtsai*, 2008). *In vitro* kísérletek (Y. Hayashi és *mtsai*, 1994; Ohsawa és *mtsai*, 1999) és a szubventrikuláris zónában tett *in vivo* megfigyelések (Caille és *mtsai*, 2004) ugyanakkor az amiloid prékurzor molekula proliferációt fokozó hatásáról számoltak be. Az ellentmondás a különböző neurogenikus locusok amiloid prékurzor fehérjével szembeni eltérő érzékenységének, annak eltérő hatásával (Zhang és *mtsai*, 2007), illetve az endogén és transzgenikus fehérjék kompetíciójával, annak normál biológiai működésre tett hatásával magyarázhatók.

A sejtproliferációra tett negatív hatásával szemben az újonnan született sejtek viszont nagyobb számban élnek túl a humán amiloid prékurzor fehérje expressziójának hatására. A jelenség a humán prékurzor fehérje antiapoptotikus hatását tükrözi, mely a p38 mitogén-aktiválta protein kináz/MEF2 szignálúton keresztül valósul meg (Perez és *mtsai*, 1997). A sejtek későbbi differenciálódására a prékurzor fehérje expressziója megfigyelésünk szerint nincs hatással. A humán prékurzor molekula sejttúlélést segítő hatása ugyanakkor markánsan különbözik attól a drámaian ellentétes expressziós hatástól, amit az A $\beta$  túltermeléshez és plak leterakódáshoz vezető prékurzor fehérje expresszió vált ki (Baron és *mtsai*, 2008; Donovan és *mtsai*, 2006).

Vizsgálatainkat ingergazdag környezetben tartott állatokon is elvégeztük. A megváltozott állattartás önmagában sem az endogén, sem a transzgenikus prékurzor fehérje szintjét nem változtatta meg. A humán amiloid prékurzor fehérje expressziós hatásától függetlenül – tehát mind a vad típusú, mind a PDGF-hAPP<sub>wt</sub> transzgenikus állatokban - jelentős sejtszaporodást tapasztaltunk a normál állatházi körülmények között tartott állatokhoz képest. Előző tanulmányok eredményeit figyelembe véve ezt elsősorban a futókerék ketrecbe helyezése válthatta ki, ami az ingergazdag környezet jelenlétén túl szükséges a sejtszaporulat fokozásához (Kempermann és *mtsai*, 1997, 1998; van Praag és *mtsai*, 1999). Ingergazdag környezetben az újonnan született sejtek túlélése is javult, a humán amiloid prékurzor fehérje expresszió ugyanakkor a differenciálatlan – és nem a neuronokká vagy gliasejtekké differenciálódó - sejtek számát növelte, mely a mutáns prékurzor fehérje hatásaihoz hasonló (Donovan és *mtsai*, 2006).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a humán amiloid prékurzor fehérje expressziója a differenciálódott központi idegrendszeri sejtproliferációt gátolja, azok túlélését ugyanakkor segíti. Ezeknek a sejteknek a későbbi differenciálódását a prékurzor fehérje előmozdítani nem tudja.

## **5.2. Reverzibilis tau foszforiláció, szinapszis újjáépülés és memórianyomok hibernációs állatmodellben**

### ***Visszafordítható strukturális változások a szíriai aranyhörcsög hippokampális szinapszisaiban***

Az Alzheimer-kór egyik jellegzetes hisztopatológiai tünete a tau fehérjék kóros mértékű (hiper)foszforilációja, mely az idegsejt nyúlványainak elfajulásához vezet. A környezeti hőmérséklet tartós, nagyfokú süllyedése téli álmat alvó emlősökben hibernációs állapotot válthat ki, melyben a neuronok szerkezeti átépülésekkel is járó passzív állapotba kerülnek (Arendt és *mtsai*, 2003). A neurodegeneratív

betegségekhez hasonló neurofilament- és mikrotubulusváltozások mindazonáltal reverzibilisek (Arendt és *mtsai*, 2003).

Szíriai aranyhörcsögben végzett kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a tájékozódáshoz szükséges memórianyomok tárolásában fontos szerepet játszó hippocampális piramissejtek kompartmentspecifikusan mutatnak a szinapszisok le-, majd újjáépülésére utaló strukturális változásokat. A CA3 piramissejtek dendritfáinak teljes térbeli leképezésével és részletes analízisével rámutattunk, hogy hibernáció alatt a dendritikus változások az apikális nyúlványokat érintik, a bazális dendritfákat nem. Az apikális dendritfa hossza, azon a dendrittűskék sűrűsége csökken, benne a hiperfoszforilált tau mennyisége pedig növekedett. Korábbi tanulmányok arra hívták fel a figyelmet, hogy hibernáció alatt a poszt-szinaptikus denzitás fehérjei disszociációra képesek, hogy az eutermiába való visszatéréskor az újjáépülő szinapszisok számára egy gyorsan hozzáférhető szelektív protein raktárat kínálhassanak (von der Ohe és *mtsai*, 2007). Kísérleteinkben a szinaptikus regresszióval együtt történő tau hiperfoszforiláció a szolubilis hiperfoszforilált tau fehérje fenti mechanizmusban játszott szerepét veti fel. A tau fehérje a poszt-szinaptikus denzitásban interaktív fehérje partnerei számára vázként funkcionál, deléciós mutánsokban egy Src kináz (Fyn) mediálta mechanizmus kiesése miatt az NMDA receptorok a poszt-szinaptikus PSD-95 fehérjével nem tudnak kapcsolatot kialakítani (Hoover és *mtsai*, 2010; Ittner és *mtsai*, 2010). Kísérleteinkben a strukturális változások mellett megállapítottuk, hogy hibernációban a PSD-95 fehérje szintje csökkent, ami az eutermiába kerülés után normalizálódott. Feltételezzük, hogy a tau fehérje foszforilációja csökkenti a mikrotubulusokhoz való kötődését, mely egy fentihez hasonló mechanizmus révén a szinapszis leépüléséhez vezet.

***Kognitív változások a reverzibilis tau foszforiláció tükrében. A hibernáció, mint az Alzheimer-kór korai modellje***

A hippocampusban talált radikális morfológia és biokémiai változások arra indítottak, hogy kognitív tesztekkel további funkcionális vizsgálatokat végezzünk. A hippocampális működés a tájékozódási tanulásban és memóriában fontos szerepet tölt be. A Hebb-Williams-féle labirintushoz hasonló útvesztőt alkalmaztuk; egyéb tesztekben, mint a Morris-féle vízi labirintus teszt vagy a többkarú labirintus teszt a szíriai aranyhörcsög nem vizsgálható (Gannon és *mtsai*, 2011; Millesi és *mtsai*, 2001). Az állatok a feladatot megtanulták, a teljesítéshez szükséges idő és a hibaráta az egymás utáni tesztalkalmak folyamán meredeken csökkent. A két hónap utáni első újratanulási teszten azonban a hibernációt mutatott, hidegben tartott, de hibernációt nem mutatott és az euterm állatok hasonló hibarátaát mutattak, mely a további két

alkalom során valamennyi kísérleti csoportban a minimumra csökkent. Ez arra utal, hogy hibernációval a memórianyom a szinaptikus regresszióval nem tűnt el, csupán ideiglenesen nem volt elérhető, melyet a dendrittűskék ébredés utáni gyors megjelenése tehetett újra elérhetővé. Hibernáció után az állatok testtömege a másik két kísérleti csoporttól nem különbözött, így nagyobb motiváció, mely a hibernációt mutatott állatokra hatással lett volna, nem valószínű.

Megállapíthatjuk, hogy a hibernációban fellépő tau foszforiláció - és az ehhez társuló morfológiai és szinaptikus változások - nem okoznak memóriakárosodást. Feltételezzük, hogy az általunk leírt kontrollált és reverzibilis tau foszforilációnak sokkal inkább egy neuroprotektív programban lehet szerepe. A reverzibilis fehérje foszforiláció általános jelenség, mely hibernációban előmozdítja az állapothoz feltétlenül szükséges csökkent metabolikus rátát (Storey és Storey, 2004, 2007). Az agyvelő hőmérsékletének csökkenése növekvő excitabilitással (Volgushev és *mtsai*, 2000) jár. Ezt a funkcionális károsodáshoz vezető folyamatot akadályozhatja meg hatékonyan a tau foszforiláció az NMDA-receptor-függő jelátviteli mechanizmusok ideiglenes szétkapcsolásával – ismert, hogy a tau hiperfoszforiláció NMDA receptor-indukálta mechanizmusok gátlásával, inaktiválásával jár (Hoover és *mtsai*, 2010; Tackenberg és Brandt, 2009).

Az Alzheimer-kór már korai fázisában megfigyelhető tau hiperfoszforilációnak mint korai kompenzációs mechanizmusnak tulajdonítanak újabban jelentőséget (Morris és *mtsai*, 2011): a fehérje változása csökkenti a serkentés/gátlás érzékeny egyensúlyában fellépő kilengéseket és a neuronhálózatokban megfigyelt diszritmiákat (Palop és Mucke, 2009; Roberson és *mtsai*, 2007). A hibernált állatok rövid ébredési periódusokkal szakítják meg nyugalmi állapotukat, mely rendkívül energiaigényes folyamat (Heldmaier, 2011). Feltételezzük, hogy ezáltal a tau foszforiláció okozta neuroprotektív változások visszafordíthatóak, az Alzheimer-kór későbbi fázisában megfigyelt irreverzibilis változások megelőzhetőek maradnak.

### **5.3. A p21Ras fehérje expressziójának hatása a differenciált agykéregben**

#### ***A p21Ras fehérje neurotrofikus hatása***

A vizsgált G-fehérje megnövelt neuronális expressziója jelentős átalakulást okozott a már differenciált sejtek szerkezeti felépítésében. Az afferens kapcsolatok számát és mintázatát tükröző dendritok radikális változásokon estek át, mind a neokortexben, mind a hippocampusban.

Neokortikális piramissejtek esetén a bazális és apikális dendritfák proximális és intermedier szegmenseinek felszíne megnövekedett, amihez az átmérő növekedésén



túl az V. rétegi piramissejtek esetén a szegmensek hossznövekedése is hozzájárult. A magas p21-Ras fehérje expresszió a dendritfák szegmenssűrűségét fokozta, így egy összetettebb arborizáció jött létre. Korrelációs vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a növekedés a dendritfa geometriájának megváltozása nélkül történt. Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy a piramissejtek eltérő populációjában bizonyos arányok szigorúan megtartottak (Larkman, 1991a, 1991b). Így az alapi átmérő és a disztális szegmenseket jellemző dendritvégek száma a transzgenikus populációban talált megnövekedett mérőszámok esetében is arányban állt a megváltozott dendritfelszínnel. Ez az eredmény azért is szembeszökő, mert a változások egy már differenciált kérgi struktúrában zajlottak, ami a korlátozott növekedési lehetőségek miatt aberráns növekedés irányába is elmozdíthatta volna a növekedési folyamatot. Ritka esetben tapasztaltuk csupán, hogy olyan, sokadik elágazódás utáni dendritszegmensek jelentek meg, melyet vad típusúban nem azonosíthattunk.

A szinapszisok száma a dendritfelszín nagyságával szigorú korrelációt mutat (Feldman, 1975; M. L. Feldman és Dowd, 1975). További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a serkentő szinapszisok helyeit jelző dendrittüskék (Colonnier, 1968) sűrűsége a megnövekedett dendritfelszínen a dendritszegmens átmérőjétől és a sejttesttől való távolságtól függetlenül megemelkedett. A dendrittüskék összetétele típusukat tekintve ugyanakkor nem változott, az éretlen dendrittüskék, filopodiumok aránya nem gyarapodott. Eredményeink összecsengenek azon *in vitro* tanulmányokkal, melyek a Ras fehérje-függő mitogén-aktivált protein kináz szignálrendszer szerepét hangsúlyozták a dendrittüskék keletkezésében (Alonso és *mtsai*, 2004; Goldin és Segal, 2003; G. Y. Wu és *mtsai*, 2001).

A p21Ras fehérje neuromorfológiai hatásait az archikortexben is el kívántuk végezni. A hippocampális piramissejtek a plaszticitással kapcsolatos kutatások fő célpontjai, neurofilamentumaik és mikrotubulusaik összetétele a dendritikus plaszticitást előmozdítandó lazább szerkezetű, szinaptikus bemeneteik a neokortikális piramissejtektől eltér (D. A. Turner és *mtsai*, 1998). A neokortexhez hasonlóan a hippocampusz ösztérfogata is megnövekedett a transzgenikus állatokban. Ehhez döntően a megnagyobbodott principális sejtek járulhattak hozzá, hiszen azok a kéreg számban domináns populációját alkotják (Braitenberg, 1978), dendritjeik adják az agyi régiók volumenének nagy részét (Cajal, 1955). A piramissejtek sejtteste a CA2-4 régiókban valóban megnagyobbodott, a CA1 régióban azonban változatlan maradt. Ez a jelenség a CA1 piramissejttestek növekedésének korai lezárultával függhet össze, hiszen azok mérete a posztanatalis 3. napon a CA2-4 régióbeliekkel megegyezik (Tole és *mtsai*, 1997; Zimmer és Haug, 1978), felnőtt állatban azonban azokhoz képest

jelentősen kisebb marad (Cajal, 1955). Vizsgálatainkhoz két okból is ezt a CA1 régióbeli piramissejt populációt választottuk. A CA1 régióbeli piramissejtek különösen képesek szerkezeti átépülésre, plaszticitási hajlamuk nagy (Pyapali és *mtsai*, 1998; D. A. Turner és Schwartzkroin, 1980). Ugyanakkor a dendritfa növekedését a sejttest növekedésétől függetlenül is vizsgálhattuk, ellentétben a neokortexben találtakkal, ahol a bazális dendritfa annak függvényében növekedett.

A neokortikális piramissejtekben találtakhoz hasonlóan a jelentősen megemelkedett p21Ras expresszió jelentős növekedést váltott ki az apikális és bazális dendritfák felszínében és kiterjedésében. Ehhez a dendritszegmenseknek mind az átmérő-, mind a hossznövekedése hozzájárult. Különösen a bazális dendritfán figyeltük meg Sholl analízisünkkel a dendritszegmensek sűrűségének növekedését, amihez a dendritvégek sejttesttől való távolodása is társult. A neokortikális piramissejtekben találtakhoz hasonlóan a sejt növekedése a geometriai elvek (Larkman, 1991a, 1991b) megtartása mellett történt, így a dendritörzs alapi átmérője szigorúan korrelált a dendrit összfelszínével és a dendritvégek számával.

#### ***A p21Ras fehérjét expresszáló piramissejtek inter-neuronális kapcsolatának változásai***

A dendritek szerkezeti és funkcionális átépülése függ a szinaptikus aktivitástól (Groc és *mtsai*, 2002; Maletic-Savatic és *mtsai*, 1999), a beérkező afferensek folyamatos hatásától (D. A. Turner és *mtsai*, 1998). A szinaptikus kapcsolatok fenntartásában és újjraépítésében a neurotrofinoknak fontos szerepe van, melyek G-fehérjéken (Bar-Sagi és Feramisco, 1985; Scott és Luo, 2001), így a p21 fehérjén keresztül (Phillips és Belardo, 1994) fejtik ki hatásukat. Az inter-neuronális kapcsolatok kialakulása és stabilizációja a pre- és posztzinaptikus partnerek kölcsönös egymásra hatása révén alakul ki (Cohen-Cory, 2002). Míg a preszinaptikus struktúra szerepét a folyamatban sokáig az első lépésnek tartották (Sanes és Lichtman, 2001), a posztzinaptikus oldal differenciálódása akár már a preszinaptikus partner hiányában is elkezdődhet (Lin és *mtsai*, 2001; Yang és *mtsai*, 2001).

A vizsgált transzgenikus egértörzsben kimutattuk, hogy a p21Ras fehérje expressziója fokozza az őt expresszáló neuronokon az afferensek számát. A szinapszisok keletkezését a fehérje feltevésünk szerint mind a pre-, mind a posztzinaptikus oldalról segítheti. A VGLUT1<sup>+</sup> interhemiszfériális és kommisszurális végződések száma a kérgi volumennövekedéshez képest kisebb arányban csökken, a piramissejtek axonján az *en passant* szinapszisok helyét jelölő boutonok sűrűsége pedig növekszik, mely preszinaptikus p21Ras hatásra utal. A kommisszurális axonokon ez utalhatna a posztzinaptikus, p21Ras fehérjét ugyancsak expresszáló piramissejt

hatására is, de a kortikostriális axonokon hasonló varikozitás növekedést tapasztaltunk, a striális neuronok viszont nem expresszálják a transzgént (Heumann és *mtsai*, 2000). Ezzel szemben a p21Ras fehérjét expresszáló piramisajt dendriteken a VGLUT2<sup>+</sup> talamokortikális afferensek sűrűsége nő, mely a posztszinaptikus indukció lehetőségére utal, a talamikus neuronok ugyanis nem expresszálják a transzgént (Heumann és *mtsai*, 2000). A kéreg IV. rétegében szemcses sejtek sokaságát találjuk (Cajal, 1955), melyek a talamikus afferensek fő célpontjai (Benshalom és White, 1986). A transzgenikus állatban azonban a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának a piramisajt rétegekhez viszonyított relatív hiánya és a piramisajtokban találtakhoz hasonló morfológiai változások teljes hiánya (változatlan sejttest- és dendrit méretek, illetve dendritsűrűség) arra utal, hogy ezek a sejtek nem expresszálják a transzgént. Ez arra utal, hogy a talamikus afferensek számának növekedése a piramisajt p21Ras expressziójának posztszinaptikus indukciós hatása miatt alakulhat ki.

Az inter-neuronális kapcsolatok működéséhez a nemspecifikus innerváció trofikus hatásai is szükségesek. Így a kolinerg beidegzés segíti a kérgi szinapszisok kialakulását (Hohmann és Berger-Sweeney, 1998) és az afferens impulzusokra adott kérgi válaszkészséget (Gu, 2002), a noradrenerg beidegzéssel együtt pedig segíti az aktivitásfüggő szinaptikus átépülést (Gu, 2002; Otani és *mtsai*, 1998). A transzgenikus állatokban talált megnövekedett kolinerg, és a kérgi volumennövekedés ellenére változatlan katekolaminerg végződéssűrűség a kérgi glutamaterg szinapszisok képződésének facilitációjára utal. A plasztikus változások előremozdulását tükrözi a többszörös szinapszisok (multiple synaptic boutons) számának megkétszereződése is, mely az információ terjedésének több posztszinaptikus partner általi diverzifikálására és sokszorozódására utal.

A principális sejtek működését gátló interneuronok szabályozzák, szinkronizálják összehangolt gátló működésük révén (Freund és Buzsáki, 1996). Szaporinál konjugált vezikuláris GABA transzmitter (VGAT) ellenes antitest használatával képesek voltunk a gátló interneuronokat szelektíven elpusztítani *in vivo* kísérleteinkben. Míg a serkentő szinapszisokat a változás nem érintette, a gátló terminálisok legnagyobb része elpusztult. A gátló terminálisok és sejttestek valamennyi vizsgált populációjában, így a parvalbumin<sup>+</sup>, calbindin<sup>+</sup>, calretinin<sup>+</sup>, VGLUT3<sup>+</sup>, NPY<sup>+</sup> és szomatosztatin<sup>+</sup> csoportokban egyaránt radikális változást tapasztaltunk, melyet markáns gliális fagocitózis kísért. A strukturális változásokat a serkentés/gátlás ideglettani egyensúly felborulása kísérte: a szabadon mozgó állatok ledált hippocampusából végzett EEG-elvezetésekben patológiás tüzelési mintázatok, magas amplitúdójú kisülések jelentek meg, melyek a nem károsított kéregben nem jelentek meg.

Feltételeztük, hogy a p21Ras transzgenikus egértörzsben megfigyelt sejtnövekedés és a serkentő szinapszisok számának növekedése megváltozott gátló beidegzés mintázattal jár. A korábbiakkal összhangban úgy találtuk, hogy a törzs egyedeiben a transzgént csak a piramissejtek expresszálják, az interneuronok nem, így utóbbiakban végbemenő változások nem a transzgén, hanem egy adaptív mechanizmus hatásait tükrözik. A GABA<sup>+</sup>, ezen belül pedig a parvalbumin<sup>+</sup>, calbindin<sup>+</sup> és calretinin<sup>+</sup> interneuronok sejtest mérete nem változott, sűrűségük pedig a kérgi megnagyobbodással arányban csökkent, mely számuk változatlanságára utal. (Egyedül a calretinin<sup>+</sup> sejtek sűrűségében találtunk a kérgi megnagyobbodáshoz képest enyhén nagyobb mérvű csökkenést). A sejtek alaktanában nem találtunk változást, de azok nyúlványaikkal követték a kérgi növekedést, típusuktól függően a rájuk jellemző kérgi rétegeken továbbra is végighúzódtak. A piramissejtek körüli gátló szinapszisok száma ugyanakkor növekedett, mely különösen annak fényében jelentős, hogy általános sűrűségük a kérgi rétegek expansziójával arányban csökkent. Arra következtetünk, hogy a megnövekedett, gazdagabb serkentő innervációt kapó piramissejtek gátló kontrollja reaktívan megnövekedett, melyet a posztzinaptikus p21Ras expresszió válthatott ki; egy indirekt, a kérgi működést több tételen befolyásoló és módosuló hatásmechanizmust ugyanakkor nem zárhatunk ki.

#### ***Az afferens depriváció és az önkéntes fizikai aktivitás hatásai a p21Ras expresszió tükrében***

A kritikus periódus lezárulta után a bajuszszőrök eltávolítása nem jár a kérgi reprezentációs területek, ún. barrelek átépülésével (Kossut, 1985; Weller és Johnson, 1975), amin a p21Ras sokszoros neuronális expressziója sem változtatott. A barrelek és a köztük lévő („interbarrel”-ek) részek arányosan növekedtek, a barrelek szélén található calretinin<sup>+</sup> double-bouquet sejtek helyzete nem változott. Utóbbi neuronok a barrelek szélén vertikálisan elterülő axonfájukkal laterális gátlás kialakítása révén képesek a barrelek funkcionális önállóságát biztosítani (DeFelipe és mtsai, 1990; Somogyi és Cowey, 1984).

A piramissejtek afferens információ fogadására alkalmas kompartmentjei a dendritok, melyek – mint azt előző kísérleteinkben láttuk - afferens depriváció esetén degenerációs jelenségeket mutatnak. A transzgént nem expresszáló VGLUT2<sup>+</sup> talamokortikális afferensek sűrűsége a III/IV. rétegi piramissejt dendritszakaszokon csökkent, a serkentő szinapszisok helyeit jelző tüskék sűrűsége ugyanakkor nem változott. Megállapíthatjuk ugyanakkor, hogy a p21Ras expresszió megakadályozta a vad típusúakban bekövetkező dendritszakaszok hosszának csökkenését, átmérőjük zsugorodását, ezáltal nagyobb dendritikus, így lehetséges szinaptikus felszínt

biztosított az idegsejteknek. A p21Ras szinaptikus kapcsolatokat védő hatását bizonyítja, hogy a transzgént expresszálo idegsejtek megnövekedett dendrittüske sűrűsége depriváció után sem változott.

Előző kísérleteinkben megállapítottuk, hogy az önkéntes fizikai aktivitás serkenti az idegsejtek plasztikus változásait és az ezt lehetővé tevő morfológiai átépülést. A vad típusú állatokban megfigyelt dendritnövekedést azonban túlszárnyalták a p21Ras fehérjét magas szinten expresszálo hippokampális piramissejtek. Ez mind a dendritszegmensek átmérőjének, mind az apikális dendritfa szegmens denzitásának fokozott növekedésében is megnyilvánult a sejttesttől mért távolságtól függetlenül. Míg az apikális dendritfa proximális részét magába foglaló stratum radiatumban a serkentő szinapszisok sűrűsége szignifikánsan nem változott, az apikális dendritfán a dendrittüskék sűrűsége a vad típusú állatokban megfigyelthez képest még fokozottabban növekedett. Ezek a dendritikus változások a p21Ras fehérje dendritikus növekedést és átépülést, a szinapszis képzést segítő hatását sugallják proaktív környezeti körülmények között.

***A p21Ras expresszió hatásmechanizmusa a vizsgált transzgenikus egértörzsben, összefüggések a korai Alzheimer-kórban fellépő neuronális szerkezeti változások tükrében***

A p21Ras fehérje jelentőségét korai tanulmányok a neurotrofinok szignál transzdukciójában a fejlődő idegrendszerben méltatták (Bar-Sagi és Feramisco, 1985; Guerrero és *mtsai*, 1986; Noda és *mtsai*, 1985). A Ras szupercsaládba tartozó más proteinek, így a RhoA G-fehérje ugyanakkor már a kialakult dendritával rendelkező idegsejtek további növekedésére, alaktani változásaira is hatással van: így a RhoA aktivitás gátolja (Nakayama és *mtsai*, 2000), míg a Cdc42 és Rac aktivitás növeli (Redmond és Ghosh, 2001; Ruchhoeft és *mtsai*, 1999) a dendritek növekedési és elágazási dinamikáját. Ez összecseng azokkal a megállapításokkal, hogy a neuronális és szinaptikus aktivitás Rho G-fehérje-függő folyamaton keresztül befolyásolja az aktin citoszkeleton változását, ezáltal a dendritnövekedést (Z. Li és *mtsai*, 2002; Sin és *mtsai*, 2002). A p21Ras fehérje-függő mitogén-aktivált protein kináz kaszkád szerepét ugyancsak kimutatták aktivitásfüggő szinapszisképzésben és dendritnövekedésben (G. Y. Wu és *mtsai*, 2001), és ebben utaltak a Ras fehérje által modulált Rac és Cdc42 szignálút vonal aktiválására is (Katoh és *mtsai*, 2000; Negishi és Katoh, 2002). Ezek a hatások a differenciált idegrendszerben annak tükrében lehetségesek, hogy a neurotrofinok *trk* receptorokon keresztül felnőtt korban is működnek, hatásukat a p21Ras fehérje aktiválása révén közvetítik (Fryer és *mtsai*, 1996; M. Hayashi és *mtsai*, 2000; Merlio és *mtsai*, 1992). A vizsgált egértörzs piramissejtjeiben a dendritikus

mikrotubulusok száma (Seeger és *mtsai*, 2003) és az ahhoz köthető strukturális fehérjék mennyisége (Holzer és *mtsai*, 2001) nő, mely a mitogén-aktivált protein kináz kináz gátlásával megfordítható (Arendt és *mtsai*, 2004). Ezek alapján feltételezzük, hogy a leírt változások a mikrotubulusok mitogén-aktivált protein kináz-függő átrendeződésének tulajdoníthatók.

A használt egérmodellben a transzgenikus expresszió abban az életkorban, a posztnatális 15. napon, kezd csak emelkedni, amikor a posztmitotikus neuronok morfológiai differenciálódása nagyban befejeződött (Heumann és *mtsai*, 2000). A 15. posztnatális napon a piramissejt testének mérete tovább nem növekszik (Miller, 1981), a dendritfa végső alakja kialakult, a növekedési csúcsok a nyúlványokon eltűnnek (Juraska, 1982; Wise és *mtsai*, 1979). A transzgenikus expresszió csak hetekkel ezután éri el az endogén expressziót meghaladó szintet (Heumann és *mtsai*, 2000), amikor a dendritfa növekedés a harmadik posztnatális hét befejeztével további növekedést már nem mutat (Eayrs és Goodhead, 1959; Juraska és Fifkova, 1979; Wise és *mtsai*, 1979). Eredményeink arra utalnak, hogy a p21Ras fehérje működése jelentősen befolyásolja nemcsak a fejlődő, hanem már differenciált neuronok szerkezeti átépülését.

Az Alzheimer-kór egy olyan, már differenciált idegrendszerben jelentkező betegség, mely jellemzően a piramissejtek mikrotubulusainak átrendeződésével jár. A betegség korai szakaszában a tau struktúrfehérje expressziója (Sadot és *mtsai*, 1998) és foszforilációja (Greenberg és *mtsai*, 1994) a p21Ras fehérje közvetítésével történik, melyeket a megemelkedett szintű növekedési és mitogén faktorok aktiválnak (Connor és *mtsai*, 1997; Crutcher és *mtsai*, 1993; Fahnstock és *mtsai*, 1996; Fenton és *mtsai*, 1998; Gomez-Pinilla és *mtsai*, 1990). A p21Ras fehérje által aktivált mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) szintje Alzheimer-kórban emelkedik (Drewes és *mtsai*, 1992), mely nemcsak egy neurodegeneratív változásra adott sejtszintű válasz, hanem már a betegség korai szakaszában fellépő jelenség, mely a tau-hiperfoszforiláció és amiloid képződés előtt, azokat megelőzve történik (Gärtner és *mtsai*, 1999). Mindezen tényekre alapozva feltételezzük, hogy a vizsgált transzgenikus állatban leírt morfofunkcionális változások az Alzheimer-kór korai fázisában történő – természetesen más léptékű -, p21Ras fehérje modulálta neuronális szerkezeti átrendeződést jellemezheti.

#### 5.4. Az endokannabinoid metabolizmus változásai Alzheimer-kórban

##### ***Neuronális mechanizmusok, retrográd jelátvitel változásai***

##### *A 2-arachidonoil-glicerol metabolizmusával kapcsolatos megfigyelések*

Az endokannabinoidok mind perifériásan (Yoles és *mtsai*, 1996), mind a központi idegrendszerben (Ludányi és *mtsai*, 2008) neuroprotektív hatásúak, melyet kannabionoid receptorokon keresztül (Palazuelos és *mtsai*, 2009) közvetítenek. Mikroléziós modellben kimutatták, hogy az A $\beta$  infúzió növeli a 2-arachidonoil-glicerol szintjét a hippocampusban (van der Stelt és *mtsai*, 2006), melyet az endokannabinoid újrafelvétel (reuptake) gátlása tovább fokoz, ami védi az idegsejteket a károsodástól. Munkánkban ezzel ellentétben megmutattuk, hogy a neurofibrilláris degeneráció jeleit mutató idegsejtek csökkentik a fenti endokannabinoid ligandot lebontó enzimek – így a monoacilglicerol-lipáz és az ABHD6 – szintjét. Az előrevetített 2-arachidonoil-glicerol szint növekedés a retrográd jelátvitel révén csökkenti a preszinaptikus oldalról a gátló neurotranszmitterek felszabadulását. Az immunhisztokémiai vizsgálataimhoz csatlakozó, a munkacsoportban végzett *ex vivo* kísérletek valóban elhúzódó depolarizáció indukálta gátláscsökkenést mutattak ki CA1 piramissejtek gátló afferenseiben. A gátló szinapszisok ily módon való elcsendesítése a neuronokat túlérzékenyíti, mely a neuronhálózatok korábban tapasztalt, A $\beta$  indukálta excitabilitását (Minkeviciene és *mtsai*, 2009) megmagyarázza. A gátló enzimek szintjének csökkenése nem csupán az endokannabinoid ligand szint növekedéséhez, hanem annak ellenőrizetlen „szivárgásához” (leak) vezethet, mely a retrográd szignál időbeli összehangoltságát ronthatja. Mivel a gátló szinapszisok az Alzheimer-kórban fellépő károsodásokkal szemben ellenállóbbak, mint a serkentő szinapszisok (Bell és *mtsai*, 2006), a jelenség hosszú távon a neuronhálózatok egészséges működéséhez nélkülözhetetlen serkentés-gátlás egyensúly felborulásához vezethet (Busche és *mtsai*, 2008; Hauser és *mtsai*, 1986).

Az Alzheimer-kór egyik fő patohisztokémiai jele a – főleg serkentő (Lacor és *mtsai*, 2004) - szinapszisok pusztulása. A CB<sub>1</sub> receptor expresszió ugyanakkor nem mutatott a preszinaptikus markerekkel párhuzamos csökkenést. A 2-arachidonoil-glicerol megváltozott metabolizmusának fényében valószínűsítjük, hogy eredményeink nem a betegségben megfigyelt általános szinapszis pusztulást tükrözik vissza. A periszomatikus, endokannabinoid kontroll alatt álló gátló szinapszisok neurokémiai homogenitása (Kano és *mtsai*, 2009) azt sugallja, hogy Alzheimer-kórban a megváltozott 2-arachidonoil-glicerol metabolizmus egy speciális szinapszis populáció



működését, ezáltal a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulás szabályozását károsítja.

#### *Az anandamid metabolizmusával kapcsolatos megfigyelések*

A központi idegrendszerben történő endokannabinoid mediálta hatásoknak a 2-arachidonoil-glicerol mellett az anandamid is kiváltója. Az anandamid ugyanakkor nemcsak kannabinoid receptorokon, hanem vanilloid receptoron keresztül is képes kifejteni hatását (Gavva és *mtsai*, 2004; A. Tóth és *mtsai*, 2009). További kísérletekben ezt a kannabinoid receptortól független, de endokannabinoid okozta mechanizmust vizsgáltuk Alzheimer-kórban.

Szemben a 2-arachidonoil-glicerol metabolikus enzim szintekben talált változásokkal, az anandamid szintézist és lebontást végző enzimek expressziója Alzheimer-kórban nem változott. Valószínűsítjük, hogy a zsírsav-amid-hidroláz szintjének Braak 6 stádiumú mintákban való emelkedési tendenciája a mikroglia sejtek fokozott enzimtermelésével függ össze (Benito és *mtsai*, 2003; Ramirez és *mtsai*, 2005). Nem találtunk változást a TRPV<sub>1</sub> receptor expressziós szintjében sem a betegség progressziója folyamán. Ezzel összhangban a munkához kollaborációban kapcsolódó farmakológiai vizsgálatok sem találtak változást a TRPV<sub>1</sub> receptor kötési kapacitásában különböző stádiumú Alzheimer-betegségben elhunyt hippokampális mintái között. Jóllehet ezek az adatok az TRPV<sub>1</sub> receptor mediálta anandamid szignálrendszer változatlanlansága mellett szólnak, figyelembe kell vennünk, hogy anandamid szintézisre más enzimek is képesek (G. M. Simon és Cravatt, 2008), és az Alzheimer-kórban meglévő esszenciális foszfolipid prékurzorok mennyiségéről sincsenek ismereteink.

#### *A mikroglialis endokannabinoid metabolizmus változásai*

A mikroglia sejtek Alzheimer-kórban állapotuktól függően ellentétes folyamatokban vehetnek részt. A migráló sejtek CB<sub>2</sub> receptorokat expresszálnak, a receptorok aktivációja a pro-inflammatoros citokinek termelését csökkenti; aktivált alakjukban ugyanakkor a CB<sub>2</sub> receptorok szintje csökken, mely ellentétes irányú, káros folyamatokat indít el (Klegeris és *mtsai*, 2003).

A bontó enzimek szintjének neuronokban tapasztalt csökkenésével ellentétben a mikroglia sejtek metabolikus enzim expressziójukat más irányban változtatták. A 2-arachidonoil-glicerol lebontásához és szintézishez szükséges enzimek kiemelten jól detektálhatókká váltak Alzheimer-kórban elhunytak mintáiban vizsgált mikroglia sejtekben. A mikroglia sejtek A $\beta$  plakkok körül illetve magában a plakkokban halmozott feltűnő gyakorisággal fordultak elő. Feltételezzük, hogy a felerősödött 2-arachidonoil-glicerol

metabolizmus megváltozott, nem szabályozott endokannabinoid „mikroklímát” hoz létre a környező szinapszisok számára, mely azok károsodásához vezethet. Eredményeink alapján az Alzheimer-kórban fellépő neurodegeneratív jelenségek egyik fontos tényezője a neuron-glia interakció károsodása lehet, melyet a megváltozott endokannabinoid metabolizmus okozhat.

### **5.5. Proliferációs képesség és differenciálatlan sejtek azonosítása a szaglórendszerben**

#### ***Sejtszaporodási vizsgálata alacsony enkefalizációs indexű állatmodellben az életkor függvényében***

A központi idegrendszer válasz- és alkalmazkodási képessége függ a régió plaszticitásától, melyet felnőtt korban is segíthet új neuronok létrejötte és integrációja (Lledo és *mtsai*, 2006; Rakic, 2002). Az enkefalizációs index emelkedésével a neurogenikus képesség csökken (Taupin és Gage, 2002), így a legfejlettebb emlősökben és emberben az erre potenciálisan képes területek azonosítása és vizsgálata, különösen magasabb életkorban, nehéz. Az alacsony enkefalizációs indexű sündisznó (*Echinops Telfari*) alkalmas kísérleti alanynak látszott annak vizsgálatára, milyen agyi területeken marad fenn neurogenesis a neurodegeneratív folyamatokkal sokszor együtt járó előrehaladott életkorban is.

A hasonló tömegű és korú emlős laborállatokkal (pl. patkány) ellentétben a sündisznó agyának több, filogenetikailag különböző korú területén találtunk nagyfokú neurogenezist kétéves korban (patkányban ez már igen magas életkornak számít). A BrdU<sup>+</sup> sejtek mellett további nagyszámú, BrdU<sup>-</sup>/DCX<sup>+</sup> éretlen sejtet találtunk a neo-, paleo- és archikortexben is, melyek érett neuronális markereket nem expresszáltak. Ez arra utal, hogy sündisznóban több agyterületen is jelentős differenciálatlan, „alvó” (dormant) tartalék sejtpopulációk (Gomez-Climent és *mtsai*, 2008) vannak jelen. Öt- és hétéves állatokban, bár kisebb, de még mindig jelentős mennyiségben találtunk újonnan született vagy éretlen sejteket, kisebb számban a paleo- és neokortexben, magasabb számban a gyrus dentatusban és bulbus olfactoriusban. Különösen az olfactoros rendszerben volt szembeszökően magas a differenciálatlan sejtek száma az igen magas életkorú sündisznók agyában. Ezek az eredmények buzdítottak arra, hogy az ember szaglórendszerében keressünk olyan sejteket, melyek öregedésben, neurodegeneratív betegségekben egy tartalék sejtpopulációt képezhetnek a szaglórendszer számára.

***Differenciálatlan sejtek idős emberek szaglórendszerében***

Az Alzheimer-kór egyik tünete az anosmia, a szaglásképeség csökkenése (K. A. Jellinger és Attems, 2005). Rágcsálókban, így patkányban és egérben, naponta több tízezer sejt képződik újonnan és vándorol a rostrális migrációs útvonalon a szaglógumóba, itt periglomeruláris interneuronokká differenciálódnak, hogy az állat számára legfontosabb érzékszervének működését, plaszticitását fenntartsa és tökéletesítse (Kornack és Rakic, 2001; Lois és Alvarez-Buylla, 1994). Az ember olfactoros rendszerében újonnan született sejtek a második életév után nincsenek (Arellano és Rakic, 2011; Bergmann és *mtsai*, 2012; Sanai és *mtsai*, 2011), differenciálatlan sejtek jelenlétéről azonban ellentmondó információk vannak birtokunkban (Curtis és *mtsai*, 2007). Egy újonnan azonosított kalcium-szenzor fehérjét (Wagner és *mtsai*, 2000) neuronális markerként használva azonban sikerült az ember szaglórendszerében egy mindezidáig ismeretlen, elhelyezkedésében egyedülálló, teljes differenciálódást nem mutató sejtcsoportot azonosítanunk.

Az ember tractus olfactoriusát neuronmentes képletként említik, melyben rostrális migráció hiányában vándorló sejtek nincsenek, csupán a retrobulbaris és prepiriform régiókhoz közel azonosítottak „eltévedt” (displaced) sejteket (Kopsch és Rauber, 1940). Egy nemrég azonosított kalcium-kötő fehérje, a secretagogin (Wagner és *mtsai*, 2000) detektálása révén bipoláris sejtek gazdag csoportját azonosítottuk a tractus olfactorius teljes hosszában, különösen annak héji régiójában. Jóllehet a jellegzetes morfológia migráló sejtek képét veti fel, a bipolárisan húzódó hosszú nyúlványok a régióban párhuzamos futó axonokhoz való alaki alkalmazkodás lehetőségét is felveti (Ibrahim és *mtsai*, 2000; Riederer és *mtsai*, 2004).

Preszinaptikus markerekkel való kapcsolatuk alapján a tractus olfactoriusban azonosított secretagogin<sup>+</sup> sejtek neuronhálózatba ágyazott idegsejtek lehetnek. Ilyen afferens kapcsolatra utaló kontaktust mindazonáltal ritkán találtunk, és a sejtestben differenciált neuronokra utaló markereket, mint a NeuN (Mullen és *mtsai*, 1992) vagy a System A aminosav transzporter 2-t (SAT-2)(Jenstad és *mtsai*, 2009) nem tudtunk azonosítani. Ezzel ellentétben a secretagogin<sup>+</sup> sejtek PSA-NCAM, calretinin és  $\beta$ -III-tubulin immunoreaktivitást mutattak, mely a neuronok plasztikus tulajdonságaira, éretlen mivoltára utal. A sejtek neuronális voltára utal továbbá, hogy tipikus gliális markert, így GFAP-t, nem expresszáltak.

Secretagogin<sup>+</sup> sejtek igen nagy számban vannak jelen egér és majom bulbus olfactoriusában, legnagyobb részük periglomeruláris interneuron (Mulder és *mtsai*, 2009). Humán mintáinkon mind a plexiform, mind a granuláris rétegekben találtunk secretagogin expressziót, a periglomerulárisan található sejtek gyakorisága pedig

kiugróan magas volt. Secretagogin<sup>+</sup> neuronok emberben így nemcsak a tractus olfactoriusban, hanem az egész perifériás szaglőrendszerben jelen vannak, ott domináns sejtpopulációt alkotnak.

### ***A tractus olfactorius sejtjeinek változásai Alzheimer-kórban***

Megvizsgáltuk, hogy az Alzheimer-kórban tapasztalt degeneratív változások kiterjednek-e a secretagogin<sup>+</sup> sejtek érintettségére. A tractus olfactorius secretagogin<sup>+</sup> neuronjai hiperfoszforilált tau fehérjét tartalmaztak, számuk a kor előrehaladtával csökkent, melyet az Alzheimer-kór súlyossága fokozott. A bulbus olfactorius secretagogin<sup>+</sup> sejtjei ugyanakkor nem mutattak citoskeletális elváltozásokat, azok száma a kor és a betegség előrehaladtával változatlan maradt. A bulbáris sejtek neuronális identitásának változatlanságát húzzák alá azon eredményeink is, melyek nem találtak különbséget más kalcium-kötő fehérjékkel – így parvalbimunnal, calbindinnel és calretininnel – való ko-expressziós mintázatukban sem.

A bulbus olfactorius periglomeruláris rétegében és a tractus olfactoriusban A $\beta$  lerakódást Alzheimer-kórban elhunytak mintáiban nem azonosítottunk, így az amiloid lerakódás közvetlen hatását humán anyagunkban tanulmányozni nem tudtuk. Vizsgálatainkat ezért egy olyan transzgenikus egérmodellben is megismételtük, melyek amiloid lerakódást mutatnak a bulbus olfactoriusban is. (Tractus olfactoriusban ilyen vizsgálatot nem tudtunk elvégezni, mert az anatómiai struktúra egérben hiányzik). A periglomeruláris secretagogin<sup>+</sup> interneuronok sűrűségét, alaktanát az amiloid lerakódás nem befolyásolta, és nem találtunk változást a rostrális migrációs útvonal bulbusba belépő secretagogin<sup>+</sup> sejtjeinek számában sem.

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az ember tractus olfactoriusának secretagogin<sup>+</sup> neuronjai szelektíven pusztulnak Alzheimer-kórban. Ennek a plasztikus, teljes differenciálódást nem mutató sejtpopulációnak pusztulása szerepet játszhat az Alzheimer-kórban tapasztalható szaglőkéesség csökkenésének kialakulásában.

## **5.6. Az extracelluláris mátrix Alzheimer-kórban megfigyelt változásai**

### ***A perineuronális mátrix életkor- és érettségfüggő megjelenésének filogenetikai aspektusai***

Emlősökben végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a neuronok sejtteste és proximális dendritjei körül az extracelluláris mátrix kialakulása arra az időszakra esik, amikor az idegsejt differenciálódása befejeződik, afferens szinapszisei kialakulnak (Brückner és mtsai, 2000; Köppe és mtsai, 1997; Murakami és mtsai, 1997; Nakagawa és mtsai, 1987). Az extracelluláris mátrix kialakulásának és a neuronális

differentiálódás közötti kapcsolatra egy filogenetikai vizsgálattal világítottunk rá. A házi csirkék fészekhagyó állatok, a tojásból való kikelés után azonnali funkcionális aktivitást és érettséget mutatnak (Corner és Bakhuis, 1969; Lippe, 1995; Rogers, 1993), neuronjai gyakorlatilag teljesen differentiálódtak, melyre a felnőttel megegyezően fejlett dendritfájuk és a dendrittüskék megléte utal (Tömböl, 1988, 1995). Házicsirkékben már a tojásból való kikelés után egy nappal igen nagy számban találtunk perineuronális hálót, mely arra utal, hogy a perineuronális mátrix az idegsejtek és az inter-neuronális kapcsolatok differentiálódása után, illetve azzal egyidőben veszi körül a neuronális kompartmenteket. Megállapítottuk, hogy a perineuronális mátrix az emlőskökhöz hasonlóan csak bizonyos neuron populációk körül kondenzálódik jól detektálható perineuronális hálóként, így gyorsuló parvalbumin<sup>+</sup> idegsejtek, kisagymagok neuronjai vagy Purkinje sejtek körül, míg kolinerg és monoaminerg neuronok körül aggregátum alapú extracelluláris mátrixot nem találtunk.

### ***A periszinaptikus mátrix morfológiai megjelenése***

A perineuronális háló az idegsejt teste és proximális dendritjei körül összefüggő burkot alkot, mely csak a szinapszisok helyén hálószerűen hiányos. További munkáinkban a periszinaptikus mátrix szelektív megjelenítésének lehetőségére koncentráltunk. Több agyi régiót vizsgálva a talamuszban fedeztünk fel nagy számban egy perineuronális hálótól független mátrix akkumulációt, mely mérete alapján periszinaptikus struktúra lehetett. Egy ilyen periszinaptikus mátrix struktúra izolált megjelenítési lehetőségére előzetes tanulmányok is felhívták a figyelmet (Brückner és mtsai, 2008), azokat periszinaptikus vagy periaxonális hüvelyeknek neveztük el.

A talamuszban azonosított periszinaptikus hüvelyek főként gátló végződéseket, de serkentő specifikus afferenseket is körülvettek. Ultrastrukturális vizsgálattal igazoltuk, hogy a gyűrűszerű képletek valóban szinapszisokat burkolnak be, melyek főként gátló, de serkentő természetűek is lehetnek. A periszinaptikus hüvelyek meglétét humán mintákban is igazoltuk. Ember külső térdestestében az extracelluláris mátrixnak ezt az izoláltan megjeleníthető periszinaptikus fenotípusát különleges, szélsőséges elrendezésben láthattuk: a neuronok körvonalát a periaxonális hüvelyek valósággal kirajzolták anélkül, hogy összefüggő mátrixháló jött volna létre a poszt-szinaptikus sejten. Elektron mikroszkópos vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy ezen struktúrák a dendriten láncszerűen egymás mellett végződő szinapszisokat vesznek körül.

### ***Az extracelluláris mátrix szerepe neuropatológiai elváltozásokban***

A proteoglikánok szerepét Alzheimer-kórban több szemszögből is vizsgálták. Neuritikus – de nem diffúz – amiloid plakkokban és azok környezetében több heparán-

szulfát proteoglikán (így az agrin, a szindekán, a glipikán) és kondroitin-szulfát proteoglikán jelenlétét kimutatták (DeWitt és *mtsai*, 1993; O'Callaghan és *mtsai*, 2008; Snow és *mtsai*, 1994), ahol az A $\beta$  amiloid aggregációjában és stabilizációjában játszhatnak szerepet (Fraser és *mtsai*, 1992; Snow és *mtsai*, 1994). Proteoglikánok közvetlenül képesek kapcsolódni a tau fehérjéhez (Defossez és *mtsai*, 1986) és azok kórosan fibrilláris formájához (Su és *mtsai*, 1992; Verbeek és *mtsai*, 1999), és befolyásolják az amiloid prékuzor fehérje metabolizmusát a  $\beta$ -szekretáz enzim gátlása révén (Scholefield és *mtsai*, 2003). Munkánkban az extracelluláris mátrix neurodegeneratív folyamatokban betöltött szerepét más szemszögből vizsgáltuk, azok perineuronális, legfőképp periszinaptikus rendeződésére és változására koncentráltunk.

A hippocampusban zajló tanulási- és memóiafolyamatok a szinapszisok folyamatos, aktivitásfüggő átépülése révén tudnak megvalósulni. Az ehhez szükséges neuroplaszticitási hajlam azonban egyúttal sérülékennyé is teszi a hippocampális neuronokat öregedésben és stresszben (McEwen, 1999). Korábbi, agykéregben végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a szinapszisokat stabilizáló, így plaszticitást csökkentő (Berardi és *mtsai*, 2003; Pizzorusso és *mtsai*, 2002) perineuronális hálók védik a neuronokat az oxidatív stressz, excitotoxicitás valamint az Alzheimer-kórban és öregedésben fellépő A $\beta$  lerakódás káros hatásaitól.

A hippocampusban kevés perineuronális hálót azonosítottunk, mely összecseng az agyterület kiemelkedő plaszticitási képességével. Perineuronális hálókat főleg parvalbumin<sup>+</sup> sejtek, de más emlősökkel ellentétben (Celio és *mtsai*, 1998; Drake és *mtsai*, 1991) calretinin<sup>+</sup> és calbindin<sup>+</sup> interneuronok körül is megfigyeltünk, mely az emberi hippocampusz interneuronjainak eltérő működésére, egyedi szerveződésére utalhat. Piramissejtek körül azonban, szemben más emlősben találtakkal (Brückner és *mtsai*, 1999), perineuronális hálókat egyáltalán nem tudtunk detektálni. A mátrixburoknak ez a szembeszökő, kizárólagos hiánya nemcsak a hippocampális piramissejtek plaszticitási képességét, de egyúttal sérülékenységét is tükrözi.

A perineuronális hálók hiánya mellett az izolált periszinaptikus hüvelyek nagy száma és jellegzetes eloszlása keltette fel figyelmünket. Különösen nagy sűrűségben fordultak elő a gyrus dentatus hilusában és az entorhinális kéregben, melyek a hippocampusz formáció legplasztikusabb és legsérülékenyebb területei (Koyama és *mtsai*, 2004). Az entorhinális kéregben elsőként jelennek meg az Alzheimer-kórra jellemző patológiás neurofibrillumok (de Calignon és *mtsai*, 2012). Míg periszinaptikus hüvelyek az ember bazális ganglionjaiban (Brückner és *mtsai*, 2008) és ismertetett saját eredményeink szerint a talamuszban főként gátló szinapszisok körül fordulnak

elő, a hippocampusz hilusában és a szomszédos CA3 régió stratum radiatumában azokat serkentő szinapszisok körül azonosíthattuk.

A perineuronális hálók folyamatos borítékként jelennek meg az idegsejteken, szabadon hagyva az afferens szinapszisok helyeit; a megfigyelésből kiindulva általánosan arra következtettek, hogy a szinapszisokat is körülvevő extracelluláris mátrixot a posztszinaptikus sejt termeli (Celio és *mtsai*, 1998). A perineuronális hálóktól független periszinaptikus mátrix akkumulációk jelenléte azonban a preszinaptikus neuron mátrix termelésének lehetőségét is felvetette. Ennek neuropatológiai jelentőségét a mátrix kémiai heterogenitásának feltérképezésével céloztuk felderíteni.

Kombinált immunhisztokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a szinapszisok körüli extracelluláris mátrix kémiaileg heterogén. A posztszinaptikus oldalon az aggregátum alapú mátrix összefüggő perineuronális hálókat alkotott, melyek mind a periszinaptikus, mind a peridendritikus területen nagyszámú gátló és serkentő szinapszist ágyazott magába. A preszinaptikus kompartment körül azonban brévikan<sup>+</sup> és CRTL-1<sup>+</sup> mátrixot találtunk, mely a posztszinaptikus oldalra nem terjedt rá - ez az elektronmikroszkópos megfigyelés magyarázza, miért találhattunk perineuronális hálóktól független mátrixgyűrűket szinapszisok körül fénymikroszkóppal fluoreszcens hisztotechnikával. Brévikánt és link-fehérjét ugyanakkor mielinhüvelyes axonban is találtunk, ami a fehérje preszinaptikus eredetére, annak axonális transzportjára utalhat.

Kérgi és szubkortikális régiókban az extracelluláris mátrix összetétele, komponenseinek expressziós szintje Alzheimer-kórban (Jenkins és Bachelard, 1988; Morawski, Brückner, és *mtsai*, 2010; Morawski, Brückner, Jäger, és *mtsai*, 2012), illetve releváns transzgenikus egérmodellben (Morawski, Pavlica, és *mtsai*, 2010) nem változott. A hippocampusz azonban különösen sérülékeny a neurodegeneratív és öregedési folyamatokban. Megállapítottuk, hogy előrehaladott stádiumú Alzheimer-kórban és ennek megfelelő hisztopatológiai jeleket mutató transzgenikus egérmodellben a vizsgált extracelluláris mátrix komponensek – így a brévikan, link-fehére és aggregátum – szintje jelentősen megemelkedett, mely az intercelluláris tér molekuláris átrendeződésére, a mátrix összetevők megnövekedett metabolizmusára utal. A biokémiai változáson túl morfológiai megfigyeléseket is tettünk. Más régiókban tett korábbi megfigyelésekkel összhangban (Brückner és *mtsai*, 1999) a perineuronális hálókkal körülvett neuronok nem mutattak Alzheimer-kórra jellemző citopatológiai elváltozást a hippocampuszban. Ez összecseng azzal a ténnyel, hogy sérülékeny



szubkortikális neuronok (pl. Meynert mag, locus coeruleus, raphe-magok idegsejtjei) körül ritkán található perineuronális háló (Morawski, Brückner, és *mtsai*, 2010).

Munkánkban azonban egy másik neuronális kompartment körüli kondroitin-szulfát proteoglikán tartalmú mátrix akkumulációt is azonosítottunk, mely a preszinaptikus struktúra szelektív védelmét szolgálhatja. A periszinaptikus hüvelyek különösen nagy számban fordultak elő a hippocampusz formáció kiemelten sérülékeny területein, és ezt a neurodegeneráció előrehaladott volta sem befolyásolta. Kimutattuk továbbá, hogy ez a strukturálisan stabil maradó periszinaptikus mátrixváz vezikuláris glutamát- és GABA transzportert tartalmazó terminálisokat fog körül, mely funkcionáló szinapszisok meglétére, azok sikeres védelmére utal. Mivel a periszinaptikus hüvelyek sűrűsége tau-patológiát mutató dendritek mentén változatlan sűrűségben volt jelen, arra következtetünk, hogy a feltehetően preszinaptikus neuron által termelődött periszinaptikus mátrix akkor is képes megvédeni a sejt „saját” efferens szinapszisait, ha a posztiszinaptikus neuron (dendrit) elfajulást mutat. A periszinaptikus mátrix jellegzetes kémiai összetétele, szinaptoprotektív szerepe révén az idegsejtek közötti információáramlás, ezáltal a kognitív képességek, és azok neurodegeneratív betegségekből tapasztalt elváltozásában fontos szerepet tölthet be.

### 5.7. Tudományos munkásság összefoglalása

Doktori értekezésemben a neuronok Alzheimer-kórban fellépő funkcionális-anatómiai változásait vizsgáltam. A transzgenikus egér-, és további kísérletes állatmodelleken, valamint humán mintákon tett legfontosabb megállapításaim a következők:

1. Különböző amiloid prékurzor protein transzgenikus egérmodelleken végzett funkcionális kísérletekkel kimutattam, hogy a nem amiloidogén humán fehérje expressziója trofikus és neuroprotektív hatású *in vivo*. Az amiloid lerakódáshoz vezető amiloid prékurzor protein expresszió ugyanakkor - a korábban hangsúlyozott fokális sérüléseken kívül – a funkcionális depriváció okozta degeneratív jelenségeket képes radikálisan súlyosbítani.
2. A hibernációs állatmodellben tett neuromorfológiai megfigyeléseim kompartment-specifikusan szerveződő reverzibilis neurofibrillum képződést és szinaptikus leépülést bizonyítottak. Ez önmagában az emlékenyom elvesztésével nem, csupán annak ideiglenes hozzáférhetetlenségével járt.
3. Genetikai egérmodellen bizonyítottam, hogy az Alzheimer-kór korai fázisát jellemző, a növekedési faktorok szignál transzdukciójában résztvevő p21H-ras fehérje expressziójának növekedése koordinált neuronális növekedést, a szinaptikus kapcsolatok gyarapodását váltja ki. Potenciózza az ingergazdag környezet okozta trofikus, és megállítja a depriváció okozta degeneratív változásokat.
4. A retrográd szinaptikus jelátvitelben szerepet játszó endokannabinoidok metabolizmusában eltérő változásokat találtam Alzheimer-kórban. Míg az anandamid metabolizmusban nem láttam változást, a 2-arachidonoil-glicerol lebontásáért felelős enzimek szintjének posztzinaptikus csökkenését azonosítottam, mely a protektív hatású retrográd jelátvitel csökkenéséhez vezetett. Mikroglia sejtekben ugyanakkor ellentétes előjelű enzimváltozást mutattam ki, mely a neuron-glia interakció átalakulásának jelentőségét veti fel.
5. Új neuron populációt azonosítottam az ember tractus olfactoriusában. A plasztikus neurokémiai jegyeket mutató, differenciálatlan sejteket Alzheimer-kórban kiemelten sérülékenynek találtam, mely a betegségben jelentkező anozmiával kapcsolatban bírhat jelentőséggel.

6. Azonosítottam a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix periszinaptikus típusát, meghatároztam pre- és posztzinaptikus régiójának heterogén neurokémiai összetételét. Kimutattam, hogy Alzheimer-kórban több periszinaptikus mátrix komponens expressziós szintje növekszik, és a periszinaptikus mátrix védelmet nyújt a szinapszisok degenerációja ellen.

## **6. Supplementum**

Ez a fejezet a táblázatokat tartalmazza, melyeket a szöveg könnyebb olvashatósága végett itt ismertetem. A táblázatokra való hivatkozások az Anyag és Módszer, valamint az Eredmények fejezetben találhatóak, utóbbiak eredeti adatokat tartalmaznak, az eredmények részét képezik.

## 1. táblázat

## A kísérletekben felhasznált állatok jellemzői

Faj	Nem	Szám (db)	Kor	Hivatkozás
Egér ( <i>Mus musculus</i> )				
APdE9	hím,nőstény	30*	7 és 10 hónapos	Jankowsy és mtsai, 2004
Tg2576	hím,nőstény	28*	10 hónapos	Hsiao és mtsai, 1996
PGDF-hAPPWt	hím,nőstény	120*	2 és 7 hónapos	Rockenstein és mtsai, 1995
B6-Py8.9	hím,nőstény	32*	10 hónapos	Lamb és mtsai, 1993
p21H-Ras	hím,nőstény	146*	3 és 9 hónapos	Heumann és mtsai, 1996
Házicsirke ( <i>Gallus domesticus</i> )	hím,nőstény	12	1, 13 és 90 napos	
Sün ( <i>Echinops telfari</i> )	hím,nőstény	22	2, 3, 5 és 7 éves	
Patkány ( <i>Rattus norvegicus</i> , Wistar)	hím,nőstény	16	5hónapos	
Szíriai aranyhörcsög ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	hím,nőstény	60	3hónapos	
Egértörpe ( <i>Microtus murinus</i> )	hím,nőstény	5	4hónapos	

\* azonos alomból származó vad típusú kontrollokkal együtt

## 2. táblázat

Különböző stádiumú Alzheimer-kórban elhunytakból nyert minták adatai

Azonosító	Braak stage	Életkor (év)	Nem	Halál bekövetkezte után eltelt idő (PMD, óra)	Vizsgálat típusa
C01	kontroll*	79	nő	38	WB
C02	kontroll	55	nő	24	WB
C03	kontroll	52	nő	44	WB
C04	kontroll	82	nő	48	WB
C05	kontroll	71	nő	30	IH & WB
C06	kontroll	96	nő	16	IH
C07	kontroll	82	nő	13	IH
C08	Braak I	81	nő	17	WB
C09	Braak II	93	férfi	33	WB
C10	Braak III	105	nő	58	WB
C11	Braak III	77	nő	43	WB
C12	Braak IV	82	férfi	24	WB
C13	Braak IV	91	férfi	62	WB
C14	Braak IV	88	nő	24	WB
C15	Braak VI	69	nő	13	WB
C16	Braak VI	82	nő	12	WB
C17	Braak VI	79	nő	24	WB
C18	Braak VI	91	nő	26	WB
C19	Braak VI	71	nő	21	WB
C20	Braak VI	89	nő	26	WB
C21	Braak VI	87	férfi	18	IH
C22	Braak VI	87	nő	29	IH
C23	Braak VI	78	nő	12	IH

\* a kontroll minták neurodegeneratív megbetegedés jeleit nem mutató idős emberekből származtak

## 3. táblázat

A kísérletekben felhasznált ellenanyagok, lektinek és egyéb markerek jellemzői

Antitest	Forrás	Host	IH hígítás	WB hígítás	Hivatkozás
<i>Mátrix összetevők ellenei antitestek</i>					
Anti-humán CRTL-1 (hHAPLN1)	R & D Systems Inc.	kecske, poliklonális IgG	1:400	1:1000	Carulli és mtsai. ( 2006)
Anti-aggregán Cat-301	R. T. Matthews	egér, monoklonális IgG	1:100	-	Matthews és mtsai (2002)
Anti-aggregán Cat-315	Millipore	egér, monoklonális IgM	1:1000	-	Matthews és mtsai (2002)
Anti-aggregán Cat-316	R. T. Matthews	egér, monoklonális IgM	1:100	-	Matthews és mtsai (2002)
Anti-aggregán HAG7D4	Acris	egér, monoklonális IgG	1:10	1:50	Brückner és mtsai (2008)
Anti-aggregán AB1031	Millipore	nyúl, poliklonális IgG	1:2000	1:1000	Giamanco és mtsai (2010)
Brévikan	Santa Cruz	kecske, poliklonális IgG	-	1:500	Morawski és mtsai (2012)
Brévikan (50kDa fragment)	R. T. Matthews	nyúl, poliklonális IgG	1:2000	-	Matthews és mtsai (2002)
<i>Neuronális és gliális markerek</i>					
Calbindin	SWant	egér, monoklonális IgG	1:2000	-	Celio és mtsai (1990)
Calretinin	SWant	kecske, poliklonális IgG	1:2000	-	Schwaller és mtsai (2003)
Doublecortin (DCX)	Santa Cruz Biotech	kecske, poliklonális IgG	1:500	-	Seri és mtsai (2004)
GABA	Sigma	nyúl, poliklonális IgG	1:2000	-	Tömböl, 1988
Glutamát dekarboxiláz (GAD65/67)	Sigma	nyúl, poliklonális IgG	1:5000	-	Brückner és mtsai (2008)
HuC/D	Invitrogen	egér, monoklonális IgG	1:100	-	Härtig és mtsai (2009)
Kolin acetiltranszferáz	Millipore	nyúl, poliklonális IgG	1:200	-	Brückner és mtsai (2008)
Mikrotubulushoz asszociált fehérje 2 (MAP2)	Sigma	egér, monoklonális IgG	1:200	-	Binder és mtsai (1996)
NeuN	Chemicon	egér, monoklonális IgG	1:20	-	Mullen és mtsai (1992)
Parvalbumin	SWant	nyúl, poliklonális IgG	1:5000	-	Celio és mtsai (1990)
SAT2	F. A. Chaudry	nyúl, poliklonális IgG	1:300	-	Jenstad és mtsai (2009)
Secretagodin	M. Uhlén	nyúl, poliklonális IgG	1:2000	-	Mulder és mtsai (2009)
Secretagodin	L. Wagner	nyúl, poliklonális IgG	1:3000	-	Wagner és mtsai (2000)
Secretagodin	R & D Systems Inc.	kecske, poliklonális IgG	1:1000	-	Mulder és mtsai (2010)
SMI-311	Covance	egér, monoklonális IgG	1:500	-	Colombo és mtsai (1998)
Tirozin hidroxiláz	Millipore	nyúl, poliklonális IgG	1:500	-	Brückner és mtsai (2008)



$\beta$ -Aktin	Sigma	egér, monoklonális IgG	-	1:10000	Mulder és mtsai (2009)
$\beta$ -III-tubulin	Millipore	egér, monoklonális IgG	1:150	-	Mulder és mtsai (2009)
<i>Gliális markerek</i>					
Gliális fibrilláris savas fehérje	DAKO	nyúl, poliklonális	1:2000	-	Colombo és mtsai (1998)
S100b	Swant	nyúl, poliklonális	1:500	-	Härtig és mtsai (1999)
<i>Szinaptikus és ioncsatorna markerek</i>					
GABA A receptor $\alpha 1$	J. M. Fritschy	nyúl, poliklonális IgG	1:500	-	Fritschy és mtsai (1992)
Kv-3.1b	Alomone Labs	nyúl, poliklonális IgG	1:2000	-	Härtig és mtsai (1999)
SNAP25	Synaptic Systems	nyúl, poliklonális IgG	1:500	-	von Kriegstein és mtsai (1999)
Szinaptobrevin	Synaptic Systems	egér, monoklonális IgG	1:500	-	Mulder és mtsai (2009)
Szinaptofizin	Synaptic Systems	nyúl, poliklonális IgG	1:2000	-	Masliak és mtsai (1989)
Vezikuláris GABA transzporter (VGAT)	Synaptic Systems	nyúl, poliklonális IgG	1:500	-	Härtig és mtsai (2003)
Vezikuláris glutamát transzporter 1 (VGLUT1)	Synaptic Systems	nyúl, poliklonális IgG	1:5000	-	Kaneko és mtsai (2002)
Vezikuláris glutamát transzporter 2 (VGLUT2)	Synaptic Systems	nyúl, poliklonális IgG	1:2000	-	Kaneko és mtsai (2002)
<i>Lektinek</i>					
Helix aspersa agglutinin (HAA)	Sigma	biotinilált	1:50	-	Härtig és mtsai (1992)
Vicia villosa agglutinin (VVA)	Sigma	biotinilált	1:50	-	Härtig és mtsai (1992)
Wisteria floribunda agglutinin (WFA)	Sigma	biotinilált	1:50	-	Härtig és mtsai (1992)
<i>Pályakövető anyag, egyéb antitest</i>					
Biotinilált dextrán amin	Molecular Probes	-	1 $\mu$ l, 20%	-	Zayats és mtsai (2002)
BrdU	Sigma	-	50 $\mu$ g / ttg	-	Franke és mtsai (2004)
anti-BrdU	AbD Serotec Morphosys	patkány, poliklonális IgG	1:4000	-	Franke és mtsai (2004)
$\beta$ -Amiloid	Millipore	egér, monoklonális IgG	1:200	-	Thal és mtsai (1999)
APP, C-terminális fragmens	Calbiochem	egér, monoklonális IgG	-	1:2000	Rossner és mtsai (1998)
APP, N-terminális fragmens	Chemicon/Millipore	egér, monoklonális IgG	-	1:2000	Rossner és mtsai (1998)
Humán amiloid $\beta$ -fehérje 1-17 szakasz	Chemicon/Millipore	egér, monoklonális IgG	-	1:5000	Seeger és mtsai (2009)
PHF tau	Pierce	egér, monoklonális (AT8)	1:1000	-	Braak és mtsai (1994)
6E10	Chemicon/Millipore	egér, monoklonális IgG	-	1:5000	Rossner és mtsai (1998)
22C11	Chemicon/Millipore	egér, monoklonális IgG	-	1:2000	Rossner és mtsai (1998)

## 4. táblázat

Primer szomatoszenzoros kéreg II/III. rétegi komisszurális piramisisejtek dendritjeinek jellemzői a Tg2576 egértörzsben

Szegmens	Szám (db)		Hosszúság (μm)		Felszín (μm <sup>2</sup> )		Térfogat (μm <sup>3</sup> )		Átlagos átmérő (μm)		Alapi átmérő (μm)	
	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus
B1	4,02 ± 0,31	3,85 ± 0,27	12,26 ± 0,81	12,18 ± 0,93	46,48 ± 2,51	44,87 ± 2,53	15,96 ± 1,13	15,12 ± 0,95	1,36 ± 0,05	1,30 ± 0,05	1,39 ± 0,05	1,33 ± 0,05
B2	7,01 ± 0,35	6,86 ± 0,41	30,64 ± 02,05	27,89 ± 1,66	55,22 ± 2,79	48,32 ± 2,09	10,52 ± 0,68	9,12 ± 0,51	0,82 ± 0,03	0,79 ± 0,03	1,31 ± 0,03	1,29 ± 0,03
B3	8,13 ± 0,42	7,96 ± 0,37	38,43 ± 1,73	36,64 ± 1,52	54,48 ± 2,57	47,19 ± 1,72	7,52 ± 0,49	5,96 ± 0,25	0,53 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,78 ± 0,02
B4	6,01 ± 0,68	6,13 ± 0,76	39,95 ± 1,82	41,28 ± 1,71	48,89 ± 2,58	47,32 ± 1,90	5,71 ± 0,49	5,04 ± 0,24	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,57 ± 0,02	0,61 ± 0,01*
B5	4,21 ± 0,54	4,52 ± 0,61	30,31 ± 2,14	37,27 ± 2,43	32,78 ± 2,45	42,03 ± 3,06	3,09 ± 0,26	4,22 ± 0,39	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,54 ± 0,02
B6	3,87 ± 0,65	3,97 ± 0,78	29,57 ± 4,66	35,46 ± 5,13	27,86 ± 4,59	36,35 ± 4,79	2,25 ± 0,42	3,25 ± 0,46	0,30 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,53 ± 0,04*
B7	1,23 ± 0,69	1,16 ± 0,66	24,19 ± 6,92	26,22 ± 9,45	18,64 ± 4,92	26,47 ± 11,13	1,18 ± 0,31	2,36 ± 1,08	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,01	0,42 ± 0,081
ADT	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	591,83 ± 61,30	393,84 ± 31,8*	1248,02 ± 106,72	996,38 ± 60,66	329,84 ± 30,61	303,86 ± 28,77	0,96 ± 0,06	1,13 ± 0,05*	2,44 ± 0,13	2,62 ± 0,13
V1	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	35,16 ± 2,97	39,82 ± 3,15	68,87 ± 5,13	79,13 ± 6,12	10,65 ± 3,23	14,18 ± 3,87	0,71 ± 0,03	0,98 ± 0,05*	0,91 ± 0,12	1,13 ± 0,11*
V2	2,66 ± 0,51	3,11 ± 0,45	32,16 ± 3,12	36,14 ± 4,12	56,19 ± 3,96	62,54 ± 4,58	6,02 ± 2,48	7,23 ± 3,13	0,57 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,82 ± 0,13	0,87 ± 0,19
V3	2,87 ± 0,64	2,96 ± 0,67	41,26 ± 3,87	46,15 ± 4,17	49,56 ± 3,88	55,45 ± 4,02	6,31 ± 2,87	6,54 ± 3,87	0,39 ± 0,05	0,41 ± 0,04	0,46 ± 0,09	0,51 ± 0,18
O1	4,32 ± 0,27	4,17 ± 0,31	32,05 ± 2,33	30,22 ± 2,77	45,31 ± 2,55	50,60 ± 3,79	6,31 ± 0,53	8,71 ± 0,84	0,57 ± 0,02	0,68 ± 0,04*	0,66 ± 0,03	0,77 ± 0,04*
O2	4,01 ± 0,35	3,86 ± 0,29	40,34 ± 2,46	44,14 ± 3,15	52,72 ± 4,13	57,55 ± 3,77	7,06 ± 0,99	7,64 ± 0,67*	0,45 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,76 ± 0,03*
O3	3,87 ± 0,65	3,11 ± 0,45	37,12 ± 2,81	48,99 ± 4,34	47,28 ± 5,00	54,02 ± 5,28	6,95 ± 1,49	5,85 ± 0,75	0,41 ± 0,03	0,38 ± 0,03	0,57 ± 0,04	0,59 ± 0,05
O4	2,98 ± 0,64	2,74 ± 0,71	32,46 ± 4,16	45,42 ± 6,66	35,00 ± 4,84	35,97 ± 5,13	3,35 ± 0,54	2,63 ± 0,45	0,36 ± 0,02	0,26 ± 0,02*	0,54 ± 0,05	0,44 ± 0,04
O5	1,96 ± 0,99	1,55 ± 0,97	43,63 ± 11,56	43,51 ± 9,57	51,79 ± 17,59	34,49 ± 7,92	5,64 ± 2,52	2,24 ± 0,56	0,32 ± 0,02	0,22 ± 0,02*	0,43 ± 0,04	0,27 ± 0,03*
O6	8 esetben	–	18,04	–	15,13	–	1,23	–	0,25	–	–	–
O7	2 esetben	–	17,95	–	10,89	–	0,58	–	0,2	–	–	–
AD összesen			1082,62 ± 91,68	806,48 ± 60,44*	1925,65 ± 160,06	1521,50 ± 89,48	436,54 ± 40,09	392,91 ± 34,81				
BD összesen			298,32 ± 13,89	301,85 ± 1,46	445,56 ± 20,94	423,38 ± 22,15	72,85 ± 5,29	65,84 ± 4,22				

Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$

## 5. táblázat

Primer szomatoszenzoros kéreg II/III. rétegi komisszurális piramissejtek bazális dendritjeinek jellemzői a B6-Py8.9 egértörzsben

Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$

Szegmens	Szám (db)		Hosszúság ( $\mu\text{m}$ )		Felszín ( $\mu\text{m}^2$ )		Térfogat ( $\mu\text{m}^3$ )		Átlagos átmérő ( $\mu\text{m}$ )		Elágazódások száma (db)	
	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus
B1	3,77 $\pm$ 0,14	3,37 $\pm$ 0,19	1,18 $\pm$ 0,08	1,28 $\pm$ 0,06	11,86 $\pm$ 1,09	10,22 $\pm$ 0,87	43,95 $\pm$ 3,80	41,23 $\pm$ 3,53	15,16 $\pm$ 1,74	14,69 $\pm$ 1,62	3,63 $\pm$ 0,12	3,30 $\pm$ 0,17
B2	7,33 $\pm$ 0,24	6,70 $\pm$ 0,35	0,59 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,05*	25,46 $\pm$ 2,14	21,77 $\pm$ 1,15	46,94 $\pm$ 5,17	46,71 $\pm$ 3,03	9,18 $\pm$ 1,35	10,25 $\pm$ 1,11	4,60 $\pm$ 0,29	4,27 $\pm$ 0,29
B3	9,23 $\pm$ 0,59	8,50 $\pm$ 0,60	0,40 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,03*	34,62 $\pm$ 2,06	25,59 $\pm$ 1,37*	43,93 $\pm$ 4,74	42,81 $\pm$ 3,30	5,66 $\pm$ 1,02	7,07 $\pm$ 0,81	2,23 $\pm$ 0,29	3,67 $\pm$ 0,25*
B4	5,04 $\pm$ 0,58	7,26 $\pm$ 0,51	0,36 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,04*	35,93 $\pm$ 2,96	28,24 $\pm$ 1,76*	40,37 $\pm$ 3,62	37,10 $\pm$ 3,31	4,33 $\pm$ 0,58	4,70 $\pm$ 0,61	0,85 $\pm$ 0,19	1,67 $\pm$ 0,27*
B5	3,14 $\pm$ 0,44	3,71 $\pm$ 0,42	0,35 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,02	26,74 $\pm$ 3,25	24,73 $\pm$ 1,52	29,01 $\pm$ 5,13	29,47 $\pm$ 6,12	3,15 $\pm$ 0,42	3,48 $\pm$ 0,52	0,60 $\pm$ 0,42	0,90 $\pm$ 0,57
B6	2,25 $\pm$ 0,25	3,25 $\pm$ 0,75	0,24 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,04	28,06 $\pm$ 4,00	23,00 $\pm$ 4,68	20,84 $\pm$ 3,53	23,97 $\pm$ 7,17	1,37 $\pm$ 0,33	2,66 $\pm$ 1,11	0,25 $\pm$ 0,16	0,50 $\pm$ 0,38
BD összes			206,29 $\pm$ 11,13	212,66 $\pm$ 11,72	300,61 $\pm$ 17,11	360,91 $\pm$ 21,37*	51,14 $\pm$ 4,07	67,31 $\pm$ 4,99*			13,67 $\pm$ 0,83	11,60 $\pm$ 0,69*

## 6. táblázat

Immunoreaktív profilok (végződés) és varikozitások száma a B6-Py8.9 és Tg2576 transzgenikus egérmodellekben

	B6-Py8.9	vadtípusú kontroll	Tg2576	vadtípusú kontroll
<b>Immunoreaktív profilok száma (db / 1000 <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>				
ChAT	36,26 $\pm$ 2,02*	25,26 $\pm$ 1,26	36,94 $\pm$ 1,55*	28,27 $\pm$ 1,44
TH	9,84 $\pm$ 1,03	9,71 $\pm$ 0,66	15,93 $\pm$ 1,11	15,95 $\pm$ 1,73
VGluT1	159,06 $\pm$ 14,09	138,53 $\pm$ 14,51	81,19 $\pm$ 10,41*	111,21 $\pm$ 53,63
VGluT2	94,21 $\pm$ 6,82	75,03 $\pm$ 4,69	102,15 $\pm$ 5,96	100,78 $\pm$ 4,71
<b>Varikozitások száma (db / 100 <math>\mu\text{m}</math>)</b>				
Komisszurális rostok	9,43 $\pm$ 0,36*	7,22 $\pm$ 0,26	8,11 $\pm$ 0,52*	9,29 $\pm$ 0,36
Kortikostriális rostok	10,06 $\pm$ 0,29	10,37 $\pm$ 0,37	8,94 $\pm$ 0,34*	10,73 $\pm$ 0,36
<b>Boutonok közötti távolság ("varicosity spacing", <math>\mu\text{m}</math>)</b>				
Komisszurális rostok	10,61 $\pm$ 0,40*	13,85 $\pm$ 0,49	12,33 $\pm$ 0,79*	10,76 $\pm$ 0,42
Kortikostriális rostok	9,94 $\pm$ 0,29	9,64 $\pm$ 0,34	11,19 $\pm$ 0,43*	9,32 $\pm$ 0,31
VGAT <sup>+</sup> profilok száma (db / 10 $\mu\text{m}$ kerülethossz)	1,61 $\pm$ 0,06	1,69 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,04*	1,75 $\pm$ 0,06

Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$

## 7. táblázat

Piramissejtek sejtestének mérete p21-Ras transzgenikus egérben

	II/III. réteg		V. réteg	
	vadtípus	transzgenikus	vadtípus	transzgenikus
Sejtest kerülete ( $\mu\text{m}$ )	38,84 $\pm$ 0,96	49,01 $\pm$ 1,82*	42,21 $\pm$ 1,66	53,65 $\pm$ 3,37*
Sejtest metszeti területe ( $\mu\text{m}^2$ )	99,21 $\pm$ 2,76	130,18 $\pm$ 5,63*	98,66 $\pm$ 3,22	148,59 $\pm$ 5,64*

Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$

## 8. táblázat

Primer szomatosenzoros kéreg II/III. rétegi komisszurális piramissejtek bazális dendrit szegmenseinek jellemzői a p21-Ras egértörzsben

Szegmens	Szám (db)		Átmérő (μm)		Hosszúság (μm)		Felszín (μm <sup>2</sup> )		Térfogat (μm <sup>3</sup> )	
	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus
<b>B1</b>	4,67±0,20	4,43±0,20	1,27±1,72	1,73±0,07*	22,78±1,99	33,90±3,45*	79,62±4,55	155,16±13,63*	27,49±2,54	73,03±8,47*
<b>B2</b>	8,73±0,36*	7,57±0,34	0,68±0,96	0,96±0,04*	55,50±2,99	48,68±2,90	104,58±6,14	130,11±8,33*	20,14±2,21	33,73±2,92*
<b>B3</b>	9,03±0,67	9,00±0,60	0,55±0,69	0,69±0,03*	60,80±2,50	57,33±3,39	92,17±6,91	160,57±31,70*	15,38±2,22	27,1±3,61*
<b>B4</b>	5,35±0,61	6,00±0,55	0,63±0,64	0,64±0,06	58,46±3,77	59,10±4,24	90,01±7,71	109,81±10,00	12,53±1,64	19,52±2,58*
<b>B5</b>	3,37±0,54	3,72±0,47	0,59±0,59	0,59±0,05	67,54±6,43	70,18±9,03	91,57±12,08	121,00±20,23	11,13±2,01	18,63±3,90
<b>B6</b>	2,00±0,00	3,00±0,68	0,49±0,62	0,62±0,07	64,36±7,08	42,25±7,21	100,14±21,67	66,81±7,56	13,52±4,67	9,39±3,43
<b>ADT</b>	1,00±0,00	1,00±0,00	1,64±0,11	2,16±0,11*	194,16±15,97	236,15±18,4	842,43±44,88	1426,6±96,53*	360,69±25,91	826,77±76,51*
<b>V1</b>	2,00±0,00	2,00±0,00	0,86±0,13	0,93±0,09	57,95±7,34	68,39±9,46	121,15±13,45	172,56±23,4	27,27±5,17	44,77±8,88
<b>V2</b>	2,08±0,28	3,08±0,41	0,94±0,19	0,75±0,15	49,43±7,10	59,00±9,25	141,89±53,29	131,07±33,48	53,79±35,06	31,66±12,02
<b>V3</b>	3,14±0,70	2,33±0,33	0,98±0,21	0,54±0,06	60,71±12,31	71,35±8,56	179,82±56,31	122,40±23,85	57,79±27,04	15,99±4,86
<b>O1</b>	4,29±0,30	4,47±0,36	0,59±0,03	0,87±0,05*	66,07±6,02	58,76±4,55	112,58±8,39	147,12±12,7*	17,76±1,63	36,45±4,85*
<b>O2</b>	3,79±0,50	4,12±0,39	0,49±0,03	0,70±0,05*	62,47±5,53	57,99±4,16	94,63±9,68	120,28±11,31	12,89±1,78	23,96±3,47*
<b>O3</b>	2,89±0,48	3,29±0,38	0,49±0,07	0,56±0,05	63,30±5,43	50,6±10,26	97,95±17,53	105,53±28,79	14,49±4,77	18,91±7,49
<b>O4</b>	2,00±0,00	2,67±0,42	0,48±0,09	0,52±0,06	92,00±43,58	79,85±14,83	157,61±100,9	122,22±19,14	23,69±17,99	17,08±3,14
<b>AD összesen</b>							2515,75±218,81	3397,39±240,43*	687,72±82,01	1298,9±125,5*
<b>BD összesen</b>							2778,91±140,82	3775,34±271,25*	503,57±41,47	1000,15±112,27*

Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$

## 9. táblázat

Primer szomatosenzoros kéreg V. rétegi komisszurális piramissejtek bazális dendrit szegmenseinek jellemzői a p21-Ras egértörzsben

Szegmens	Szám (db)		Átmérő (μm)		Hosszúság (μm)		Felszín (μm <sup>2</sup> )		Térfogat (μm <sup>3</sup> )	
	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus
B1	3,57±0,22	3,71±0,24	1,76±0,09	2,15±0,14*	17,94±3,05	22,17±2,20	93,95±17,57	134,72±12,43*	42,02±8,87	76,37±8,67*
B2	6,57±0,39	7,43±0,49	0,85±0,05	1,15±0,11	41,52±4,13	52,21±5,79	93,21 ±10,21	154,88±12,99*	22,68±3,05	49,11±6,12*
B3	8,57±0,41	9,57±0,79	0,58±0,03	0,72±0,04*	55,86±4,18	81,95±4,37*	90,88±7,19	166,22±9,97*	15,06±1,78	27,19±3,80*
B4	6,86±0,71	5,79±0,85	0,46±0,03	0,66±0,04*	60,28±4,81	81,79±6,21*	84,05±9,07	155,99±10,51*	10,96±1,63	29,41±2,88*
B5	4,32±0,56	4,22±1,31	0,42±0,05	0,58±0,05*	47,26±7,44	65,65±4,80*	65,38±13,84	101,12±9,94*	8,27±2,22	17,37±2,56*
B6	3,38±0,71	3,00±1,00	0,52±0,13	0,49±0,09	85,05±18,62	74,67±13,58	23,44±10,43	17,72±9,63	23,44±10,43	10,57±9,63
ADT	1,00±0,00	1,00±0,00	1,59±0,16	1,59±0,10	141,39±20,48	349,88±46,43*	588,13±72,08	1390,10±177,56*	248,95±36,53	615,34±79,12*
V1	2,00±0,00	2,00±0,00	1,00±0,00	1,42±0,15	34,69±13,71	60,73±12,74	64,97±12,25	99,47±19,04	15,03±1,94	18,19±4,45
V2	1,60±0,60	1,7±0,18	1,09±0,29	0,83±0,19	45,11±7,89	40,54±8,50	98,29±34,84	108,94±31,28	22,74±11,59	30,21±10,49
V3	1,00±0,00	1,50±0,29	0,87±0,23	0,95±0,32	58,18±21,02	55,4±6,20	132,40±34,76	156,64±56,56*	30,51±9,24	45,08±22,16*
O1	5,38±0,56	6,63±0,62	0,53±0,05	1,59±0,09*	38,29±9,85	54,26±6,79	57,60±9,85	88,53±6,79*	8,91±1,89	25,82±11,9*
O2	5,17±0,58	5,28±0,48	0,42±0,03	0,57±0,03*	41,49±5,07	48,44±4,99	51,63±7,57	79,46±8,57	6,05±1,17	12,19±1,52
O3	3,71±0,8	4,00±0,59	0,39±0,04	0,41±0,04	42,31±6,39	53,35±5,12	52,08±10,27	65,68±8,85	5,61±1,43	7,66±1,41
O4	2,00±0,00	2,00±0,00	0,44±0,15	0,49±0,09	45,51±3,6	48,85±19,46	55,51±4,11	82,36±33,59	6,45±2,48	11,76±4,89
AD összesen							2143,45±293,18	3844,99±312,49*	601,42±77,85	1166,58±105,56*
BD összesen							2790,83±402,1	4961,6±363,48*	594,74±95,55	1250,21±147,69*

Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$



## 10. táblázat

VGLUT1<sup>+</sup>, VGLUT2<sup>+</sup>, ChAT<sup>+</sup> és TH<sup>+</sup> profilok sűrűsége p21-Ras transzgenikus egerek szomatoszenzoros kérégeinek a II/III. és IV. rétegében (db/1000um<sup>2</sup>)

Szegmens	Szám (db)	
	vadtípusú	transzgenikus
VGLUT1 (II/III. réteg)	205,12 ± 2,98	192,86 ± 2,51*
VGLUT2 (II/III. réteg)	15,89 ± 1,02	14,61 ± 1,14
VGLUT2 (IV. réteg)	101,93 ± 1,41	117,7 ± 2,25*
ChAT (II/III. réteg)	26,68 ± 0,68	34,51 ± 0,84*
TH (II/III. réteg)	9,82 ± 0,68	11,83 ± 0,86

Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$

## 11. táblázat

Talamikus tüskés neuronok ("spiny stellate cells") jellemzői.

	Szám (db)	
	vadtípusú	transzgenikus
Sejttest keresztmetszeti felszíne (μm <sup>2</sup> )	86,17 ± 4,07	87,76 ± 12,02
Dendritfa teljes hossza (μm)	242,04 ± 24,92	244,7 ± 28,82
Dendritfa teljes felszíne (μm <sup>2</sup> )	455,82 ± 52,79	465,09 ± 68,36
Dendrittüskék sűrűsége (db / 10 μm szegmenshossz)	4,36 ± 0,16	4,3 ± 0,16

Átlag ± standard hiba,  $p > 0,05$

## 12. táblázat

Varikozitások léptéke ("varicosity spacing", a varikozitások egymás közötti távolsága az axonon)

	Távolság (μm)	
	vadtípusú	transzgenikus
Komisszurális rostok	6,81 ± 0,17	4,53 ± 0,13*
Kortikostriatalis rostok	4,79 ± 0,08	3,56 ± 0,08*
ChAT <sup>+</sup> rostok	3,06 ± 0,07	2,95 ± 0,06
TH <sup>+</sup> rostok	3,41 ± 0,08	3,71 ± 0,08

Átlag ± standard hiba,  $p > 0,05$

## 13. táblázat

Piramissejtek és szemcses sejtek sejttestének térfogata a hippocampusban

	Sejttest térfogata (μm <sup>3</sup> )		különbség (%)
	vadtípusú	transzgenikus	
Gyrus dentatus	0,782 ± 0,028	0,907 ± 0,063*	16
CA3	1,462 ± 0,098	2,023 ± 0,215*	38
CA2	1,872 ± 0,102	2,526 ± 0,313	3
CA1	1,233 ± 0,041	1,206 ± 0,032	-1

Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$

## 14. táblázat

CA1 régióbeli piramis sejtek bazális és apikális dendritjeinek jellemzői a p21H-ras<sup>Val12</sup> egértörzsben

Szegmens	Szám (db)		Kanyargósság (tulajdonképpeni hossz / végpont távolság)		Átlagos átmérő (μm)		Hosszúság (μm)		Felszín (μm <sup>2</sup> )		Térfogat (μm <sup>3</sup> )	
	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus	vadtípusú	transzgenikus
<b>B1</b>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,04 ± 0,00	1,06 ± 0,01	1,78 ± 0,08	1,81 ± 0,08	14,43 ± 1,83	11,80 ± 1,16	66,99 ± 5,50	58,95 ± 4,56	29,42 ± 2,72	26,21 ± 2,08
<b>B2</b>	2,00 ± 0,00	2,02 ± 0,02	1,09 ± 0,00	1,10 ± 0,01	1,01 ± 0,05	1,08 ± 0,04	38,69 ± 3,71	32,99 ± 3,44	81,50 ± 6,03	75,50 ± 5,67	18,50 ± 1,27	17,68 ± 1,26
<b>B3</b>	2,96 ± 0,14	2,96 ± 0,13	1,10 ± 0,02	1,10 ± 0,00	0,63 ± 0,03	0,66 ± 0,02*	45,48 ± 3,12	46,99 ± 2,67	65,94 ± 3,83	81,21 ± 4,42*	9,85 ± 0,64	13,07 ± 0,79*
<b>B4</b>	3,33 ± 0,25	3,65 ± 0,3	1,09 ± 0,00	1,12 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,02*	46,75 ± 3,00	53,03 ± 3,13	63,17 ± 4,54	80,26 ± 5,02*	8,13 ± 0,72	11,08 ± 0,85*
<b>B5</b>	3,06 ± 0,30	3,42 ± 0,38	1,09 ± 0,01	1,11 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,44 ± 0,02*	45,33 ± 4,73	66,19 ± 4,92*	52,04 ± 6,06	91,97 ± 7,67*	5,57 ± 0,75	11,82 ± 1,30*
<b>B6</b>	2,50 ± 0,33	2,67 ± 0,47	1,09 ± 0,02	1,13 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,43 ± 0,04*	43,99 ± 7,63	65,99 ± 9,40	44,94 ± 10,90	94,59 ± 14,55*	4,54 ± 1,60	12,01 ± 0,88*
<b>ADT</b>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,06 ± 0,02	1,11 ± 0,01	3,04 ± 0,25	2,44 ± 0,26	70,51 ± 10,69	98,78 ± 14,18	536,83 ± 52,99	571,16 ± 56,23	451,29 ± 50,22	386,18 ± 43,52
<b>V1</b>	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,07 ± 0,02	1,09 ± 0,03	1,61 ± 0,21	1,39 ± 0,18	38,73 ± 7,57	44,38 ± 10,63	170,99 ± 47,66	144,69 ± 24,98	79,94 ± 27,47	53,54 ± 12,63
<b>V2</b>	3,00 ± 0,28	3,89 ± 0,26	1,10 ± 0,02	1,13 ± 0,02	0,94 ± 0,14	0,81 ± 0,10	34,83 ± 5,26	47,62 ± 7,11	95,43 ± 19,50	108,52 ± 14,32	29,55 ± 10,34	25,914,58
<b>V3</b>	2,50 ± 0,72	4,86 ± 0,96	1,06 ± 0,01	1,09 ± 0,01	0,98 ± 0,20	0,67 ± 0,05	32,80 ± 8,50	57,01 ± 7,45*	80,88 ± 22,38	114,15 ± 13,99	24,43 ± 11,69	21,383,34
<b>V4</b>	2,66 ± 0,78	4,80 ± 1,72	1,05 ± 0,02	1,08 ± 0,01	1,06 ± 0,22	0,50 ± 0,09	38,50 ± 15,81	67,22 ± 13,81	100,42 ± 37,17	102,79 ± 18,84	24,55 ± 7,86	15,64 ± 4,32
<b>O1</b>	3,44 ± 0,39	2,75 ± 0,35	1,05 ± 0,02	1,09 ± 0,02	0,84 ± 0,07	0,86 ± 0,08	56,43 ± 5,53	65,95 ± 7,34	111,12 ± 10,48	148,66 ± 17,22	26,05 ± 3,71	36,32 ± 6,33
<b>O2</b>	3,33 ± 0,37	2,83 ± 0,38	1,07 ± 0,01	1,06 ± 0,03	0,79 ± 0,08	0,74 ± 0,07	48,86 ± 6,88	55,68 ± 6,82	110,51 ± 16,79	101,02 ± 11,07	26,46 ± 4,86	17,41 ± 2,29
<b>O3</b>	2,85 ± 0,59	3,25 ± 0,75	1,08 ± 0,01	1,14 ± 0,02	0,67 ± 0,09	0,78 ± 0,07	40,55 ± 8,08	58,21 ± 15,99	67,69 ± 11,25	141,79 ± 43,26	12,69 ± 2,87	31,29 ± 11,34
<b>O4</b>	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	1,10 ± 0,01	1,11 ± 0,01	0,59 ± 0,14	0,95 ± 0,15	36,36 ± 15,24	117,40 ± 7,70	83,05 ± 53,65	342,03 ± 81,64	20,12 ± 15,76	83,98 ± 32,97
<b>AD összesen</b>							519,49 ± 60,87	690,01 ± 57,94*	1677,69 ± 130,47	1871,79 ± 168,79	796,26 ± 75,56	686,76 ± 78,99
<b>BD összesen</b>							339,28 ± 24,39	472,34 ± 31,96*	559,84 ± 40,01	823,71 ± 55,43*	110,15 ± 8,79	150,25 ± 11,96*

Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$

## 15. táblázat

Elágazódási pontok számának változása bajuszszőrtés után a p21H-ras transzgenikus egerek dendritfáiban

	Elágazódások száma (db)			
	vadtípusú		transzgenikus	
	megkímélt	deprivált	megkímélt	deprivált
Bazális dendrit	3,64 ± 0,22	4,03 ± 0,23	4,27 ± 0,26	3,77 ± 0,28
Apikális dendrit	8,15 ± 0,87	8,31 ± 1,04	9,73 ± 1,01	7,91 ± 0,81

Átlag ± standard hiba,  $p > 0,05$ 

## 16. táblázat

A dendritfákat borító cikkely (convex hull) felszínének változása bajuszszőrtés után

	Kiterjedés ( $\mu\text{m}^2$ )			
	vadtípusú		transzgenikus	
	megkímélt	deprivált	megkímélt	deprivált
Bazális dendrit	6840,14 ± 575,58	5380,13 ± 648,92*	5471,72 ± 508,74	4711,70 ± 435,52
Apikális dendrit	31781,70 ± 3736,73	25656,10 ± 3396,56	22539,20 ± 2071,86	22535,80 ± 3121,77
Oldalfácska	1393,82 ± 262,42	790,85 ± 139,68*	1069,19 ± 297,73	743,69 ± 122,78

Átlag ± standard hiba, \* $p < 0,05$

## 17. táblázat

Dendritvégek távolságának változása a sejtesttől bajuszszőrtás után

	Távolság ( $\mu\text{m}$ )			
	vadttípusú		transzgenikus	
	megkímélt	deprivált	megkímélt	deprivált
Bazális dendrit	71.79 $\pm$ 1.68	67.56 $\pm$ 2.15*	69.78 $\pm$ 1.65	62.54 $\pm$ 1.74*
Apikális dendrit	120.87 $\pm$ 3.54	116.82 $\pm$ 4.43	120.32 $\pm$ 3.42	119.31 $\pm$ 3.98

Átlag  $\pm$  standard hiba, \* $p < 0,05$ 

## 18. táblázat

BrdU<sup>+</sup> sejtek száma (db/1mm<sup>2</sup>) 1 nappal és 4 héttel az injekció után, valamint a számított túlélési arány

Genotípus	Állattartási körülmény	BrdU <sup>+</sup> sejtek száma (db)		Túlélési arány (%)
		proliferáció	túlélés	
vadtípusú	standard	112,2 $\pm$ 5,02	37,6 $\pm$ 4,34	34
vadtípusú	ingergazdag környezet	147,02 $\pm$ 26,2 <sup>a</sup>	117,2 $\pm$ 10,41 <sup>c</sup>	80
PDGF-hAPP <sub>wt</sub>	standard	88,4 $\pm$ 6,54 <sup>d</sup>	46 $\pm$ 16,92	52 <sup>e</sup>
PDGF-hAPP <sub>wt</sub>	ingergazdag környezet	125,2 $\pm$ 15,28 <sup>b</sup>	80,41 $\pm$ 10,9 <sup>b,d</sup>	64

Átlag  $\pm$  standard hiba<sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>c</sup> $p < 0,001$  vs. standard állatházi körülmények<sup>d</sup> $p < 0,001$  vs. vadttípusú ( $t$ -próba), <sup>e</sup> $p < 0,001$  vs. vadttípusú (ANOVA)

## 7. Köszönetnyilvánítás

Munkámat kiváló tanárok, kollégák, barátok, családtagok segítették és bátorították. Tudományos pályám Tömböl Teréz professzor asszony laboratóriumában indult, akitől mindenekelőtt kitartást és kérlelhetetlen szakmai pontosságot tanultam. A Semmelweis Egyetem Anatómiai Intézetében munkámat Réthelyi Miklós és Csillag András professzorok igazgatói támogatásával végezhettem. Az intézet munkatársai nap mint nap nyújtottak értékes és nélkülözhetetlen támogatást, akik közül kiemelkedik Németh Andrea, Horváth Péterné szakasszisztensek és Deák Szilvia segítsége. A lipcsei munkatársak közül Thomas Arendt, Gert Brückner és Wolfgang Härtig professzorokat, valamint Ulrich Gärtner és Markus Morawski nevét szeretném említeni, akikkel máig tartó közös munkáink biztosítják a folyamatos kapcsolatot. Ezekre a munkákra alapozva tudtam elindítani azokat a kutatásokat, melyekben Gáti Georgina és Lendvai Dávid PhD hallgatóim végeztek értékes kísérleteket, hogy téziseiket aztán sikerrel megvédhessék. Meghatározó befolyást gyakorolt gondolkodásomra Harkány Tibor professzor, akinek kérdésfelvetései új ajtókat nyitottak meg, szakmai igényessége lenyűgözött, emberi segítsége és támogatása pedig követendő példaként áll előttem.

Családom támogatása nélkül munkámat végezni nem tudtam volna. Köszönöm feleségemnek, Geszler Piroskának és gyermekeimnek a lemondással járó szeretet, szüleimnek, Dr. Lakosi Katalinnak és Dr. Alpár Balázsnak a mindmáig nem szűnő odaadó támogatást.

## 8. Irodalomjegyzék

- Adams I, Brauer K, Arelin C, Härtig W, Fine A, Mader M, Arendt T, Brückner G. (2001). Perineuronal nets in the rhesus monkey and human basal forebrain including basal ganglia. *Neuroscience*, 108(2), 285-298.
- Ahn NG. (1993). The MAP kinase cascade. Discovery of a new signal transduction pathway. *Mol Cell Biochem*, 127-128, 201-209.
- Alger BE. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol*, 68(4), 247-286.
- Alloul K, Sauriol L, Kennedy W, Laurier C, Tessier G, Novosel S, Contandriopoulos A. (1998). Alzheimer's disease: a review of the disease, its epidemiology and economic impact. *Arch Gerontol Geriatr*, 27(3), 189-221.
- Allsop D, Landon M, Kidd M. (1983). The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Res*, 259(2), 348-352.
- Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L. (2004). ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*, 11(2), 172-178. doi: 10.1101/lm.67804
- Amet LE, Lauri SE, Hienola A, Croll SD, Lu Y, Levorse JM, Prabhakaran B, Taira T, Rauvala H, Vogt TF. (2001). Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule. *Mol Cell Neurosci*, 17(6), 1014-1024. doi: 10.1006/mcne.2001.0998
- Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK. (1991). Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett*, 128(1), 126-128.
- Anderson P, Storm J, Wheal HV. (1987). Thresholds of action potentials evoked by synapses on the dendrites of pyramidal cells in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, 383, 509-526.
- Arellano JI, Rakic P. (2011). Neuroscience: Gone with the wean. *Nature*, 478(7369), 333-334. doi: 10.1038/478333a
- Arendt T, Brückner MK, Bigl V, Marcova L. (1995). Dendritic reorganisation in the basal forebrain under degenerative conditions and its defects in Alzheimer's disease. III. The basal forebrain compared with other subcortical areas. *J Comp Neurol*, 351(2), 223-246. doi: 10.1002/cne.903510204
- Arendt T, Gärtner U, Seeger G, Barmashenko G, Palm K, Mittmann T, Yan L, Hummeke M, Behrbohm J, Brückner MK, Holzer M, Wahle P, Heumann R. (2004). Neuronal activation of Ras regulates synaptic connectivity. *Eur J Neurosci*, 19(11), 2953-2966. doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03409.x
- Arendt T, Schindler C, Brückner MK, Eschrich K, Bigl V, Zedlick D, Marcova L. (1997). Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *J Neurosci*, 17(2), 516-529.
- Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkány T, Holzer M, Härtig W. (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci*, 23(18), 6972-6981.

- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 103(1), 26-35.
- Avila J. (2000). Tau aggregation into fibrillar polymers: tauopathies. *FEBS Lett*, 476(1-2), 89-92.
- Baker RE, Dijkhuizen PA, Van Pelt J, Verhaagen J. (1998). Growth of pyramidal, but not non-pyramidal, dendrites in long-term organotypic explants of neonatal rat neocortex chronically exposed to neurotrophin-3. *Eur J Neurosci*, 10(3), 1037-1044.
- Bales KR. (2012). The value and limitations of transgenic mouse models used in drug discovery for Alzheimer's disease: an update. *Expert Opin Drug Discov*, 7(4), 281-297. doi: 10.1517/17460441.2012.666234
- Bar-Sagi D, Feramisco JR. (1985). Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell*, 42(3), 841-848.
- Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonego A. (2008). IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 22(8), 2843-2852. doi: 10.1096/fj.08-105866
- Bell KF, Ducatenzeiler A, Ribeiro-da-Silva A, Duff K, Bennett DA, Cuellar AC. (2006). The amyloid pathology progresses in a neurotransmitter-specific manner. *Neurobiol Aging*, 27(11), 1644-1657. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.034
- Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*, 23(35), 11136-11141.
- Benshalom G, White EL. (1986). Quantification of thalamocortical synapses with spiny stellate neurons in layer IV of mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol*, 253(3), 303-314. doi: 10.1002/cne.902530303
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L. (2003). Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci*, 26(7), 369-378. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00168-1
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landen M, Druid H, Spalding KL, Frisen J. (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron*, 74(4), 634-639. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.030
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, 11(1), 153-163.
- Bimonte HA, Granholm AC, Seo H, Isacson O. (2002). Spatial memory testing decreases hippocampal amyloid precursor protein in young, but not aged, female rats. *Neurosci Lett*, 328(1), 50-54.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. (1986). Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. *Ann N Y Acad Sci*, 466, 145-166.
- Bindu B, Alladi PA, Mansooralikhan BM, Srikumar BN, Raju TR, Kutty BM. (2007). Short-term exposure to an enriched environment enhances dendritic branching but not brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of rats with ventral subicular lesions. *Neuroscience*, 144(2), 412-423. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.09.057
- Bisogno T, Di Marzo V. (2008). The role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: facts and hypotheses. *Curr Pharm Des*, 14(23), 2299-3305.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of



- endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*, 163(3), 463-468. doi: 10.1083/jcb.200305129
- Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Merino-Serrais P, Avila J, DeFelipe J. (2011). Abnormal tau phosphorylation in the thorny excrescences of CA3 hippocampal neurons in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 26(4), 683-698. doi: 10.3233/JAD-2011-110659
- Blosa M, Sonntag M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Matthews RT, Rübsamen R, Arendt T, Morawski M. (2013). Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body--implications for physiological functions. *Neuroscience*, 228, 215-234. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.003
- Bódi N, Csibri E, Myers CE, Gluck MA, Kéri S. (2009). Associative learning, acquired equivalence, and flexible generalization of knowledge in mild Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol*, 22(2), 89-94. doi: 10.1097/WNN.0b013e318192ccf0
- Braak E, Braak H, Mandelkow EM. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol*, 87(6), 554-567.
- Braak H, Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259.
- Braak H, Braak E, Bohl J. (1993). Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol*, 33(6), 403-408.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Braitenberg. (1978). Cortical architectonics: general and areal. In Brazier és Petsche (Eds.), *Architectonics of the cerebral cortex*. (pp. 9-29): Raven Press, New York.
- Brandt R, Hundelt M, Shahani N. (2005). Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta*, 1739(2-3), 331-354. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.018
- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A. (1993). Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*, 8(3), 183-200. doi: 10.1002/glia.440080306
- Brückner G, Grosche J, Schmidt S, Härtig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M. (2000). Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol*, 428(4), 616-629.
- Brückner G, Härtig W, Kacza J, Seeger J, Welt K, Brauer K. (1996). Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J Neurocytol*, 25(5), 333-346.
- Brückner G, Hausen D, Härtig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K. (1999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92(3), 791-805.
- Brückner G, Morawski M, Arendt T. (2008). Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience*, 151(2), 489-504. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.10.033
- Bubenaite. (1929). Über einige Erfahrungen mit der Golgi-Methode. *Z. wiss. Mikr.*, 46, 359-360.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 33(1), 95-130.

- Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O. (2008). Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science*, 321(5896), 1686-1689. doi: 10.1126/science.1162844
- Buxbaum JD, Thinakaran G, Koliatsos V, O'Callahan J, Slunt HH, Price DL, Sisodia SS. (1998). Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci*, 18(23), 9629-9637.
- Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, Prochiantz A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*, 131(9), 2173-2181. doi: 10.1242/dev.01103
- Cajal Ry. (1955). *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertébrés* (Vol. II).
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW. (2006). Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol*, 494(4), 559-577. doi: 10.1002/cne.20822
- Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX, Chang E, Fawcett J, Kuchel G, Miller FD. (1997). Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron*, 18(2), 257-267.
- Celio MR. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35(2), 375-475.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. (1998). Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci*, 21(12), 510-514. doi: Doi 10.1016/S0166-2236(98)01298-3
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*, 353(6347), 844-846. doi: 10.1038/353844a0
- Chen QS, Wei WZ, Shimahara T, Xie CW. (2002). Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*, 77(3), 354-371. doi: 10.1006/nlme.2001.4034
- Chung ES, Bok E, Chung YC, Baik HH, Jin BK. (2012). Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. *Brain Res*, 1451, 110-116. doi: 10.1016/j.brainres.2012.02.058
- Clemens LE, Heldmaier G, Exner C. (2009). Keep cool: memory is retained during hibernation in Alpine marmots. *Physiol Behav*, 98(1-2), 78-84. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.04.013
- Cohen-Cory S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science*, 298(5594), 770-776. doi: 10.1126/science.1075510
- Colombo JA, Hartig W, Lipina S, Bons N. (1998). Astroglial interlaminar processes in the cerebral cortex of prosimians and Old World monkeys. *Anat Embryol (Berl)*, 197(5), 369-376.
- Colonnier M. (1968). Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res*, 9(2), 268-287.
- Connor B, Beilharz EJ, Williams C, Synek B, Gluckman PD, Faull RL, Dragunow M. (1997). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 49(1-2), 283-290.
- Corner MA, Bakhuis WL. (1969). Developmental patterns in the central nervous system of birds. V. Cerebral electrical activity, forebrain function and behavior in the chick at the time of hatching. *Brain Res*, 13(3), 541-555.

- Cosgaya JM, Latasa MJ, Pascual A. (1996). Nerve growth factor and ras regulate beta-amyloid precursor protein gene expression in PC12 cells. *J Neurochem*, 67(1), 98-104.
- Costa DA, Cracchiolo JR, Bachstetter AD, Hughes TF, Bales KR, Paul SM, Mervis RF, Arendash GW, Potter H. (2007). Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiol Aging*, 28(6), 831-844. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.04.009
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604), 83-87. doi: 10.1038/384083a0
- Crutcher KA, Scott SA, Liang S, Everson WV, Weingartner J. (1993). Detection of NGF-like activity in human brain tissue: increased levels in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 13(6), 2540-2550.
- Cui H, Freeman C, Jacobson GA, Small DH. (2013). Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life*, 65(2), 108-120. doi: 10.1002/iub.1118
- Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW. (1996). Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 17(6), 921-933.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS. (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*, 315(5816), 1243-1249. doi: 10.1126/science.1136281
- Davies AM. (2000). Neurotrophins: neurotrophic modulation of neurite growth. *Curr Biol*, 10(5), R198-200.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 90(1), 1-13.
- de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL, Hyman BT. (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*, 73(4), 685-697. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.033
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727), 518-522. doi: 10.1038/19083
- Deák A, Bácskai T, Gaál B, Rácz E, Matesz K. (2012). Effect of unilateral labyrinthectomy on the molecular composition of perineuronal nets in the lateral vestibular nucleus of the rat. *Neurosci Lett*, 513(1), 1-5. doi: 10.1016/j.neulet.2012.01.076
- DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T, Molinari M, Jones EG. (1990). A microcolumnar structure of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cell axons. *Neuroscience*, 37(3), 655-673.
- Defossez A, Persuy P, Tramu G, Delacourte A. (1986). [Immunohistochemical study of the basic lesions of Alzheimer's disease]. *Encephale*, 12(4), 161-168.
- Desdouits-Magnen J, Desdouits F, Takeda S, Syu LJ, Saltiel AR, Buxbaum JD, Czernik AJ, Nairn AC, Greengard P. (1998). Regulation of secretion of Alzheimer amyloid precursor protein by the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Neurochem*, 70(2), 524-530.

- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.
- DeWitt DA, Silver J, Canning DR, Perry G. (1993). Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 121(2), 149-152. doi: 10.1006/exnr.1993.1081
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D. (2002). A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*, 121(1-2), 149-158.
- Dityatev A, Fellin T. (2008). Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol*, 4(3), 235-247. doi: 10.1017/S1740925X09000118
- Dityatev A, Rusakov DA. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 21(2), 353-359. doi: 10.1016/j.conb.2010.12.006
- Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M. (2010). Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci*, 33(11), 503-512. doi: 10.1016/j.tins.2010.08.003
- Doege K, Sasaki M, Yamada Y. (1990). Rat and human cartilage proteoglycan (aggrecan) gene structure. *Biochem Soc Trans*, 18(2), 200-202.
- Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. (2006). Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*, 495(1), 70-83. doi: 10.1002/cne.20840
- Drake CT, Mulligan KA, Wimpey TL, Hendrickson A, Chavkin C. (1991). Characterization of Vicia villosa agglutinin-labeled GABAergic interneurons in the hippocampal formation and in acutely dissociated hippocampus. *Brain Res*, 554(1-2), 176-185.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*, 3(10), 1141-1154.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J*, 11(6), 2131-2138.
- Duan H, Wearne SL, Morrison JH, Hof PR. (2002). Quantitative analysis of the dendritic morphology of corticocortical projection neurons in the macaque monkey association cortex. *Neuroscience*, 114(2), 349-359.
- Eayrs JT, Goodhead B. (1959). Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. *J Anat*, 93, 385-402.
- Ermini FV, Grathwohl S, Radde R, Yamaguchi M, Staufenbiel M, Palmer TD, Jucker M. (2008). Neurogenesis and alterations of neural stem cells in mouse models of cerebral amyloidosis. *Am J Pathol*, 172(6), 1520-1528. doi: 10.2353/ajpath.2008.060520
- Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ. (2003). A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res Dev Brain Res*, 141(1-2), 55-61.
- Fahnestock M, Scott SA, Jette N, Weingartner JA, Crutcher KA. (1996). Nerve growth factor mRNA and protein levels measured in the same tissue from normal and Alzheimer's disease parietal cortex. *Brain Res Mol Brain Res*, 42(1), 175-178.
- Fehér A, Juhász A, László A, Pákási M, Kálmán J, Janka Z. (2013). Serotonin transporter and serotonin receptor 2A gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 534, 233-236. doi: 10.1016/j.neulet.2012.12.020

- Fehér A, Juhász A, Pákáski M, Kálmán J, Janka Z. (2012). Gender dependent effect of DHCR24 polymorphism on the risk for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 526(1), 20-23. doi: 10.1016/j.neulet.2012.08.010
- Feldman. (1975). SERIAL THIN-SECTIONS OF PYRAMIDAL APICAL DENDRITES IN CEREBRAL-CORTEX - SPINE TOPOGRAPHY AND RELATED OBSERVATIONS. *Anatomical Record*, 181, 354-355.
- Feldman ML, Dowd C. (1975). Loss of dendritic spines in aging cerebral cortex. *Anat Embryol (Berl)*, 148(3), 279-301.
- Feng AS, Rogowski BA. (1980). Effects of monaural and binaural occlusion on the morphology of neurons in the medial superior olivary nucleus of the rat. *Brain Res*, 189(2), 530-534.
- Fenton H, Finch PW, Rubin JS, Rosenberg JM, Taylor WG, Kuo-Leblanc V, Rodriguez-Wolf M, Baird A, Schipper HM, Stopa EG. (1998). Hepatocyte growth factor (HGF/SF) in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 779(1-2), 262-270.
- Ferhat L, Chevassus-Au-Louis N, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y, Represa A. (1996). Seizures induce tenascin-C mRNA expression in neurons. *J Neurocytol*, 25(9), 535-546.
- Fitch MT, Silver J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*, 209(2), 294-301. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.05.014
- Flood JF, Morley JE, Roberts E. (1991). Amnesic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8), 3363-3366.
- Fodor KE, Pákáski M, Sántha P, Janka Z, Kálmán J. (2011). [Cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease: the "skeleton" of therapeutic hope?]. *Neuropsychopharmacol Hung*, 13(3), 163-171.
- Franke H, Krugel U, Grosche J, Heine C, Hartig W, Allgaier C, Illes P. (2004). P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience*, 127(2), 431-441. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.05.003
- Franklin, Paxinos. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Fraser PE, Nguyen JT, Chin DT, Kirschner DA. (1992). Effects of sulfate ions on Alzheimer beta/A4 peptide assemblies: implications for amyloid fibril-proteoglycan interactions. *J Neurochem*, 59(4), 1531-1540.
- Freund TF, Buzsáki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347-470. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 12(7), 897-904. doi: 10.1038/nn.2338
- Fritschy JM, Benke D, Mertens S, Oertel WH, Bachi T, Mohler H. (1992). Five subtypes of type A gamma-aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15), 6726-6730.
- Froemke RC, Poo MM, Dan Y. (2005). Spike-timing-dependent synaptic plasticity depends on dendritic location. *Nature*, 434(7030), 221-225. doi: 10.1038/nature03366
- Fryer RH, Kaplan DR, Feinstein SC, Radeke MJ, Grayson DR, Kromer LF. (1996). Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol*, 374(1), 21-40. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961007)374:1<21::AID-CNE2>3.0.CO;2-P

- Furth ME, Aldrich TH, Cordon-Cardo C. (1987). Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene*, 1(1), 47-58.
- Gaál B, Rácz E, Juhász T, Holló K, Matesz C. (2014). Distribution of extracellular matrix macromolecules in the vestibular nuclei and cerebellum of the frog, *Rana esculenta*. *Neuroscience*, 258, 162-173. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.080
- Ganguly K, Rejmak E, Mikosz M, Nikolaev E, Knapska E, Kaczmarek L. (2013). Matrix metalloproteinase (MMP) 9 transcription in mouse brain induced by fear learning. *J Biol Chem*, 288(29), 20978-20991. doi: 10.1074/jbc.M113.457903
- Gannon RL, Lungwitz E, Batista N, Hester I, Huntley C, Peacock A, Delagrange P, Millan MJ. (2011). The benzodiazepine diazepam demonstrates the usefulness of Syrian hamsters as a model for anxiety testing: evaluation of other classes of anxiolytics in comparison to diazepam. *Behav Brain Res*, 218(1), 8-14. doi: 10.1016/j.bbr.2010.11.029
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, Shen R, Zhang MY, Strassle BW, Lu P, Mark L, Piesla MJ, Deng K, Kouranova EV, Ring RH, Whiteside GT, Bates B, Walsh FS, Williams G, Pangalos MN, Samad TA, Doherty P. (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, 30(6), 2017-2024. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5693-09.2010
- Gärtner U, Holzer M, Arendt T. (1999). Elevated expression of p21ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration. *Neuroscience*, 91(1), 1-5.
- Gärtner U, Holzer M, Heumann R, Arendt T. (1995). Induction of p21ras in Alzheimer pathology. *Neuroreport*, 6(10), 1441-1444.
- Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Tóth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, Treanor JJ. (2004). Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem*, 279(19), 20283-20295. doi: 10.1074/jbc.M312577200
- Geinisman Y, Berry RW, Disterhoft JF, Power JM, Van der Zee EA. (2001). Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. *J Neurosci*, 21(15), 5568-5573.
- Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. (2010). Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience*, 170(4), 1314-1327. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.032
- Goedert M, Spillantini MG. (2011). Pathogenesis of the tauopathies. *J Mol Neurosci*, 45(3), 425-431. doi: 10.1007/s12031-011-9593-4
- Golde TE, Estus S, Usiak M, Younkin LH, Younkin SG. (1990). Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron*, 4(2), 253-267.
- Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, 255(5045), 728-730.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, 235(4791), 877-880.
- Goldin M, Segal M. (2003). Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 17(12), 2529-2539.
- Gomez-Climent MA, Castillo-Gomez E, Varea E, Guirado R, Blasco-Ibanez JM, Crespo C, Martinez-Guijarro FJ, Nacher J. (2008). A population of prenatally generated cells in the rat paleocortex maintains an immature neuronal phenotype into adulthood. *Cereb Cortex*, 18(10), 2229-2240. doi: 10.1093/cercor/bhm255

- Gomez-Pinilla F, Cummings BJ, Cotman CW. (1990). Induction of basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport*, 1(3-4), 211-214.
- Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS. (1994). Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15), 7104-7108.
- Groc L, Petanjek Z, Gustafsson B, Ben-Ari Y, Hanse E, Khazipov R. (2002). In vivo blockade of neural activity alters dendritic development of neonatal CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci*, 16(10), 1931-1938.
- Grothe M, Záborszky L, Atienza M, Gil-Neciga E, Rodriguez-Romero R, Teipel SJ, Amunts K, Suarez-Gonzalez A, Cantero JL. (2010). Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 20(7), 1685-1695. doi: 10.1093/cercor/bhp232
- Gu Q. (2002). Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience*, 111(4), 815-835.
- Guerrero I, Wong H, Pellicer A, Burstein DE. (1986). Activated N-ras gene induces neuronal differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Cell Physiol*, 129(1), 71-76. doi: 10.1002/jcp.1041290111
- Gundersen HJ. (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc*, 143(Pt 1), 3-45.
- Gundersen HJ, Jensen EB. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147(Pt 3), 229-263.
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357(6378), 500-503. doi: 10.1038/357500a0
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393), 322-325. doi: 10.1038/359322a0
- Halleskog C, Mulder J, Dahlstrom J, Mackie K, Hortobagyi T, Tanila H, Kumar Puli L, Farber K, Harkány T, Schulte G. (2011). WNT signaling in activated microglia is proinflammatory. *Glia*, 59(1), 119-131. doi: 10.1002/glia.21081
- Hamel MG, Mayer J, Gottschall PE. (2005). Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor beta in cultured astrocytes. *J Neurochem*, 93(6), 1533-1541. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03144.x
- Hardy J, Allsop D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 12(10), 383-388.
- Harkány T, Dobszay MB, Cayetanot F, Härtig W, Siegemund T, Aujard F, Mackie K. (2005). Redistribution of CB1 cannabinoid receptors during evolution of cholinergic basal forebrain territories and their cortical projection areas: a comparison between the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*, primates) and rat. *Neuroscience*, 135(2), 595-609. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.043
- Harper SJ, Bilsland JG, Shearman MS, Zheng H, Van der Ploeg L, Sirinathsinghji DJ. (1998). Mouse cortical neurones lacking APP show normal neurite outgrowth and survival responses in vitro. *Neuroreport*, 9(13), 3053-3058.
- Harris-Cerruti C, Kamsler A, Kaplan B, Lamb B, Segal M, Groner Y. (2004). Functional and morphological alterations in compound transgenic mice overexpressing Cu/Zn

- superoxide dismutase and amyloid precursor protein [correction]. *Eur J Neurosci*, 19(5), 1174-1190. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03188.x
- Härtig W, Brauer K, Bigl V, Brückner G. (1994). Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Res*, 635(1-2), 307-311.
- Härtig W, Brauer K, Brückner G. (1992). Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*, 3(10), 869-872.
- Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mader M, Reichenbach A, Brückner G. (1999). Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res*, 842(1), 15-29.
- Härtig W, Reichenbach A, Voigt C, Boltze J, Bulavina L, Schuhmann MU, Seeger J, Schusser GF, Freytag C, Grosche J. (2009). Triple fluorescence labelling of neuronal, glial and vascular markers revealing pathological alterations in various animal models. *J Chem Neuroanat*, 37(2), 128-138. doi: 10.1016/j.jchemneu.2008.10.003
- Härtig W, Stieler J, Boerema AS, Wolf J, Schmidt U, Weissfuss J, Bullmann T, Strijkstra AM, Arendt T. (2007). Hibernation model of tau phosphorylation in hamsters: selective vulnerability of cholinergic basal forebrain neurons - implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci*, 25(1), 69-80. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05250.x
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. (2007). Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci*, 27(5), 1211-1219. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4159-06.2007
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. (2002). Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 83(6), 1509-1524.
- Hauser WA, Morris ML, Heston LL, Anderson VE. (1986). Seizures and myoclonus in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 36(9), 1226-1230.
- Hausser M, Spruston N, Stuart GJ. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science*, 290(5492), 739-744.
- Hayashi M, Mitsunaga F, Itoh M, Shimizu K, Yamashita A. (2000). Development of full-length Trk B-immunoreactive structures in the prefrontal and visual cortices of the macaque monkey. *Anat Embryol (Berl)*, 201(2), 139-147.
- Hayashi Y, Kashiwagi K, Ohta J, Nakajima M, Kawashima T, Yoshikawa K. (1994). Alzheimer amyloid protein precursor enhances proliferation of neural stem cells from fetal rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(1), 936-943. doi: 10.1006/bbrc.1994.2755
- Heldmaier G. (2011). Physiology. Life on low flame in hibernation. *Science*, 331(6019), 866-867. doi: 10.1126/science.1203192
- Henze DA, Cameron WE, Barrionuevo G. (1996). Dendritic morphology and its effects on the amplitude and rise-time of synaptic signals in hippocampal CA3 pyramidal cells. *J Comp Neurol*, 369(3), 331-344. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960603)369:3<331::AID-CNE1>3.0.CO;2-6
- Heumann R. (1994). Neurotrophin signalling. *Curr Opin Neurobiol*, 4(5), 668-679.
- Heumann R, Goemans C, Bartsch D, Lingenohl K, Waldmeier PC, Hengerer B, Allegrini PR, Schellander K, Wagner EF, Arendt T, Kamdem RH, Obst-Pernberg K, Narz F, Wahle P, Berns H. (2000). Transgenic activation of Ras in neurons promotes hypertrophy and protects from lesion-induced degeneration. *J Cell Biol*, 151(7), 1537-1548.



- Hockfield S, Kalb RG, Zaremba S, Fryer H. (1990). Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55, 505-514.
- Hockfield S, McKay RD. (1983). A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(18), 5758-5761.
- Hof PR, Nimchinsky EA, Morrison JH. (1995). Neurochemical phenotype of corticocortical connections in the macaque monkey: quantitative analysis of a subset of neurofilament protein-immunoreactive projection neurons in frontal, parietal, temporal, and cingulate cortices. *J Comp Neurol*, 362(1), 109-133. doi: 10.1002/cne.903620107
- Hohmann CF, Berger-Sweeney J. (1998). Cholinergic regulation of cortical development and plasticity. New twists to an old story. *Perspect Dev Neurobiol*, 5(4), 401-425.
- Holzer M, Gärtner U, Klinz FJ, Narz F, Heumann R, Arendt T. (2001). Activation of mitogen-activated protein kinase cascade and phosphorylation of cytoskeletal proteins after neurone-specific activation of p21ras. I. Mitogen-activated protein kinase cascade. *Neuroscience*, 105(4), 1031-1040.
- Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL, Ashe KH, Liao D. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 68(6), 1067-1081. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.030
- Horch HW, Katz LC. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci*, 5(11), 1177-1184. doi: 10.1038/nn927
- Horch HW, Kruttgen A, Portbury SD, Katz LC. (1999). Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron*, 23(2), 353-364.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, YOUNKIN S, Yang F, Cole G. (1996). Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274(5284), 99-102.
- Huber G, Bailly Y, Martin JR, Mariani J, Brugg B. (1997). Synaptic beta-amyloid precursor proteins increase with learning capacity in rats. *Neuroscience*, 80(2), 313-320.
- Ibrahim M, Menoud PA, Celio MR. (2000). Neurones in the adult rat anterior medullary velum. *J Comp Neurol*, 419(1), 122-134.
- Ida M, Shuo T, Hirano K, Tokita Y, Nakanishi K, Matsui F, Aono S, Fujita H, Fujiwara Y, Kaji T, Oohira A. (2006). Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *J Biol Chem*, 281(9), 5982-5991. doi: 10.1074/jbc.M507130200
- Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT. (1997). A $\beta$  deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci*, 17(18), 7053-7059.
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*, 24(3), 173-182.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wolfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Gotz J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), 387-397. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.036
- Jacobs B, Schall M, Prather M, Kapler E, Driscoll L, Baca S, Jacobs J, Ford K, Wainwright M, Trembl M. (2001). Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study. *Cereb Cortex*, 11(6), 558-571.

- Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S. (1994). BEHAB, a new member of the proteoglycan tandem repeat family of hyaluronan-binding proteins that is restricted to the brain. *J Cell Biol*, 125(2), 495-509.
- Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S. (1995). The CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB is expressed in ventricular zones coincident with gliogenesis. *J Neurosci*, 15(2), 1352-1362.
- Jellinger K, Braak H, Braak E, Fischer P. (1991). Alzheimer lesions in the entorhinal region and isocortex in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 640, 203-209.
- Jellinger KA, Attems J. (2005). Alzheimer pathology in the olfactory bulb. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 31(2), 203. doi: 10.1111/j.1365-2990.2004.00619.x
- Jenkins HG, Bachelard HS. (1988). Glycosaminoglycans in cortical autopsy samples from Alzheimer brain. *J Neurochem*, 51(5), 1641-1645.
- Jenstad M, Quazi AZ, Zilberter M, Haglerod C, Berghuis P, Saddique N, Goiny M, Buntup D, Davanger S, FM SH, Barnes CA, McNaughton BL, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Harkány T, Chaudhry FA. (2009). System A transporter SAT2 mediates replenishment of dendritic glutamate pools controlling retrograde signaling by glutamate. *Cereb Cortex*, 19(5), 1092-1106. doi: 10.1093/cercor/bhn151
- Jhamandas JH, Cho C, Jassar B, Harris K, MacTavish D, Easaw J. (2001). Cellular mechanisms for amyloid beta-protein activation of rat cholinergic basal forebrain neurons. *J Neurophysiol*, 86(3), 1312-1320.
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA. (2004). Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(36), 13363-13367. doi: 10.1073/pnas.0403678101
- John N, Krugel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Seidenbecher CI. (2006). Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci*, 31(4), 774-784. doi: 10.1016/j.mcn.2006.01.011
- Juhász G, Földi I, Penke B. (2011). Systems biology of Alzheimer's disease: how diverse molecular changes result in memory impairment in AD. *Neurochem Int*, 58(7), 739-750. doi: 10.1016/j.neuint.2011.02.008
- Juraska JM. (1982). The development of pyramidal neurons after eye opening in the visual cortex of hooded rats: a quantitative study. *J Comp Neurol*, 212(2), 208-213. doi: 10.1002/cne.902120210
- Juraska JM, Fikova E. (1979). A Golgi study of the early postnatal development of the visual cortex of the hooded rat. *J Comp Neurol*, 183(2), 247-256. doi: 10.1002/cne.901830203
- Kaas JH, Qi HX, Burish MJ, Gharbawie OA, Onifer SM, Massey JM. (2008). Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord. *Exp Neurol*, 209(2), 407-416. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.014
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37(6), 925-937.
- Kaneko T, Fujiyama F. (2002). Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res*, 42(4), 243-250.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733-736. doi: 10.1038/325733a0

- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89(1), 309-380. doi: 10.1152/physrev.00019.2008
- Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R. (1996). Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 16(3), 1034-1040.
- Katoh H, Yasui H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M. (2000). Small GTPase RhoG is a key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Cell Biol*, 20(19), 7378-7387.
- Katona I, Sperl gh B, Magl czky Z, S ntha E, K falvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF. (2000). GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience*, 100(4), 797-804.
- Katona I, Sperl gh B, S k A, K falvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 19(11), 4544-4558.
- Katona I, Urb n GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26(21), 5628-5637. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0309-06.2006
- Katz LC, Shatz CJ. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274(5290), 1133-1138.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. (2001). Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 21(2), 372-381.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493-495. doi: 10.1038/386493a0
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*, 18(9), 3206-3212.
- Kincses ZT, Horinek D, Szab  N, T th E, Csete G, Step n-Buksakowska I, Hort J, V csei L. (2013). The pattern of diffusion parameter changes in Alzheimer's disease, identified by means of linked independent component analysis. *J Alzheimers Dis*, 36(1), 119-128. doi: 10.3233/JAD-122431
- Kirazov E, Kirazov L, Bigl V, Schliebs R. (2001). Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. *Int J Dev Neurosci*, 19(3), 287-296.
- Kirstein M, Farinas I. (2002). Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins. *Cell Mol Life Sci*, 59(11), 1787-1802.
- Klegeris A, Bissonnette CJ, McGeer PL. (2003). Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol*, 139(4), 775-786. doi: 10.1038/sj.bjp.0705304
- Knowles RB, Gomez-Isla T, Hyman BT. (1998). Abeta associated neuropil changes: correlation with neuronal loss and dementia. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(12), 1122-1130.
- Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L, Urbanc B, Hasselmo ME, Stanley HE, Hyman BT. (1999). Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9), 5274-5279.
- Kopsch, Rauber. (1940). *Lehrbuch und Atlas der Anatomie des Menschen*: Thieme, Stuttgart, N metország.

- Kornack DR, Rakic P. (2001). The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4752-4757. doi: 10.1073/pnas.081074998
- Kossut M. (1985). Effects of sensory denervation and deprivation on a single cortical vibrissal column studied with 2-deoxyglucose. *Physiol Bohemoslov*, 34 Suppl, 79-83.
- Kovács. (2009). [Therapy of Alzheimer disease]. *Neuropsychopharmacol Hung*, 11(1), 27-33.
- Kovács Z, Juhász G, Palkovits M, Dobolyi A, Kékesi KA. (2011). Area, age and gender dependence of the nucleoside system in the brain: a review of current literature. *Curr Top Med Chem*, 11(8), 1012-1033.
- Koyama R, Yamada MK, Fujisawa S, Katoh-Semba R, Matsuki N, Ikegaya Y. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 24(33), 7215-7224. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2045-04.2004
- Köppe G, Brückner G, Brauer K, Härtig W, Bigl V. (1997). Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. *Cell Tissue Res*, 288(1), 33-41.
- LaBerge D. (2005). Sustained attention and apical dendrite activity in recurrent circuits. *Brain Res Brain Res Rev*, 50(1), 86-99. doi: 10.1016/j.brainresrev.2005.04.004
- LaBerge D. (2006). Apical dendrite activity in cognition and consciousness. *Conscious Cogn*, 15(2), 235-257. doi: 10.1016/j.concog.2005.09.007
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*, 24(45), 10191-10200. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3432-04.2004
- LaFerla FM, Green KN. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). doi: 10.1101/cshperspect.a006320
- Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD. (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet*, 5(1), 22-30. doi: 10.1038/ng0993-22
- Lander C, Zhang H, Hockfield S. (1998). Neurons produce a neuronal cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*, 18(1), 174-183.
- Lanz TA, Carter DB, Merchant KM. (2003). Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis*, 13(3), 246-253.
- Larkman AU. (1991a). Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: I. Branching patterns. *J Comp Neurol*, 306(2), 307-319. doi: 10.1002/cne.903060207
- Larkman AU. (1991b). Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: II. Parameter correlations. *J Comp Neurol*, 306(2), 320-331. doi: 10.1002/cne.903060208
- Larkman AU. (1991c). Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol*, 306(2), 332-343. doi: 10.1002/cne.903060209
- Larner AJ. (1995). The cortical neuritic dystrophy of Alzheimer's disease: nature, significance, and possible pathogenesis. *Dementia*, 6(4), 218-224.
- Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K. (2001). Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol*, 58(3), 498-504.
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS. (2005). Environmental enrichment reduces Abeta levels and

- amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 120(5), 701-713. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.015
- Le R, Cruz L, Urbanc B, Knowles RB, Hsiao-Ashe K, Duff K, Irizarry MC, Stanley HE, Hyman BT. (2001). Plaque-induced abnormalities in neurite geometry in transgenic models of Alzheimer disease: implications for neural system disruption. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(8), 753-758.
- Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*, 163(1), 78-90. doi: 10.1016/j.bbr.2005.04.009
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 248(4959), 1124-1126.
- Li YT, Woodruff-Pak DS, Trojanowski JQ. (1994). Amyloid plaques in cerebellar cortex and the integrity of Purkinje cell dendrites. *Neurobiol Aging*, 15(1), 1-9.
- Li Z, Aizenman CD, Cline HT. (2002). Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron*, 33(5), 741-750.
- Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*, 410(6832), 1057-1064. doi: 10.1038/35074025
- Lindwall G, Cole RD. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, 259(8), 5301-5305.
- Lippe WR. (1995). Relationship between frequency of spontaneous bursting and tonotopic position in the developing avian auditory system. *Brain Res*, 703(1-2), 205-213.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 7(3), 179-193. doi: 10.1038/nrn1867
- Lois C, Alvarez-Buylla A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.
- Ludányi A, Erőss L, Czirják S, Vajda J, Halász P, Watanabe M, Palkovits M, Maglóczy Z, Freund TF, Katona I. (2008). Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *J Neurosci*, 28(12), 2976-2990. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4465-07.2008
- Ludányi A, Hu SS, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, Kano M, Sakimura K, Maglóczy Z, Mackie K, Freund TF, Katona I. (2011). Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. *Neuroscience*, 174, 50-63. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.062
- Luo L, Jan LY, Jan YN. (1997). Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Curr Opin Neurobiol*, 7(1), 81-86.
- Ma QH, Bagnard D, Xiao ZC, Dawe GS. (2008). A TAG on to the neurogenic functions of APP. *Cell Adh Migr*, 2(1), 2-8.
- Mabuchi M, Murakami S, Taguchi T, Ohtsuka A, Murakami T. (2001). Purkinje cells in the adult cat cerebellar cortex possess a perineuronal net of proteoglycans. *Arch Histol Cytol*, 64(2), 203-209.
- Mackie K, Katona I. (2009). Get stoned in GABAergic synapses. *Nat Neurosci*, 12(9), 1081-1083. doi: 10.1038/nn0909-1081
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, 283(5409), 1923-1927.

- Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, Bodor AL, Muccioli GG, Hu SS, Woodruff G, Fung S, Lafourcade M, Alexander JP, Long JZ, Li W, Xu C, Moller T, Mackie K, Manzoni OJ, Cravatt BF, Stella N. (2010). The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci*, 13(8), 951-957. doi: 10.1038/nn.2601
- Masliah E. (1995). Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histol Histopathol*, 10(2), 509-519.
- Masliah E, Raber J, Alford M, Mallory M, Mattson MP, Yang D, Wong D, Mucke L. (1998). Amyloid protein precursor stimulates excitatory amino acid transport. Implications for roles in neuroprotection and pathogenesis. *J Biol Chem*, 273(20), 12548-12554.
- Matesz C, Módos L, Halasi G, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bácskai T, Székely G. (2005). Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull*, 66(4-6), 526-531. doi: 10.1016/j.brainresbull.2005.06.014
- Matsuyama S, Teraoka R, Mori H, Tomiyama T. (2007). Inverse correlation between amyloid precursor protein and synaptic plasticity in transgenic mice. *Neuroreport*, 18(10), 1083-1087. doi: 10.1097/WNR.0b013e3281e72b18
- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. (2002). Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci*, 22(17), 7536-7547.
- Mattson MP. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein modulate dendrite outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. *J Neurobiol*, 25(4), 439-450. doi: 10.1002/neu.480250409
- Mattson MP. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*, 77(4), 1081-1132.
- Mayhew TM. (1979). Stereological approach to the study of synapse morphometry with particular regard to estimating number in a volume and on a surface. *J Neurocytol*, 8(2), 121-138.
- Mayhew TM. (1996). How to count synapses unbiasedly and efficiently at the ultrastructural level: proposal for a standard sampling and counting protocol. *J Neurocytol*, 25(12), 793-804.
- Mazzola C, Micale V, Drago F. (2003). Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol*, 477(3), 219-225.
- McAllister AK. (2000). Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex*, 10(10), 963-973.
- McAllister AK. (2002). Neurotrophins and cortical development. *Results Probl Cell Differ*, 39, 89-112.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. (1996). Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron*, 17(6), 1057-1064.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15(4), 791-803.
- McEwen BS. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22, 105-122. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.105
- McGuire PK, Hockfield S, Goldman-Rakic PS. (1989). Distribution of cat-301 immunoreactivity in the frontal and parietal lobes of the macaque monkey. *J Comp Neurol*, 288(2), 280-296. doi: 10.1002/cne.902880207
- McKee AC, Kowall NW, Schumacher JS, Beal MF. (1998). The neurotoxicity of amyloid beta protein in aged primates. *Amyloid*, 5(1), 1-9.

- McNamara MC, Riedesel ML. (1973). Memory and hibernation in *Citellus lateralis*. *Science*, 179(4068), 92-94.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50(1), 83-90.
- Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H. (1992). Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 51(3), 513-532.
- Miklya I, Gaszner P. (2004). Treatment possibilities of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacol Hung*, 6(4), 200-209.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK, Margolis RU. (1998). Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(2), 207-212. doi: 10.1006/bbrc.1998.8759
- Miller M. (1981). Maturation of rat visual cortex. I. A quantitative study of Golgi-impregnated pyramidal neurons. *J Neurocytol*, 10(5), 859-878.
- Millesi E, Prossinger H, Dittami JP, Fieder M. (2001). Hibernation effects on memory in European ground squirrels (*Spermophilus citellus*). *J Biol Rhythms*, 16(3), 264-271.
- Mills J, Laurent Charest D, Lam F, Beyreuther K, Ida N, Pelech SL, Reiner PB. (1997). Regulation of amyloid precursor protein catabolism involves the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Neurosci*, 17(24), 9415-9422.
- Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fulop L, Penke B, Zilberter Y, Harkány T, Pitkanen A, Tanila H. (2009). Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci*, 29(11), 3453-3462. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009
- Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML. (2004). Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol*, 33(3), 377-387. doi: 10.1023/B:NEUR.0000044197.83514.64
- Morawski M, Brückner G, Arendt T, Matthews RT. (2012). Aggrecan: Beyond cartilage and into the brain. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(5), 690-693. doi: 10.1016/j.biocel.2012.01.010
- Morawski M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Arendt T. (2010). Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169(3), 1347-1363. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.022
- Morawski M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Matthews RT, Arendt T. (2012). Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol*, 22(4), 547-561. doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00557.x
- Morawski M, Brückner MK, Riederer P, Brückner G, Arendt T. (2004). Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol*, 188(2), 309-315. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.04.017
- Morawski M, Pavlica S, Seeger G, Grosche J, Kouznetsova E, Schliebs R, Brückner G, Arendt T. (2010). Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*, 31(7), 1254-1256. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.023
- Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. (2011). The many faces of tau. *Neuron*, 70(3), 410-426. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.009
- Mountcastle VB. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain*, 120 ( Pt 4), 701-722.

- Moya KL, Benowitz LI, Schneider GE, Allinquant B. (1994). The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev Biol*, 161(2), 597-603. doi: 10.1006/dbio.1994.1055
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*, 20(11), 4050-4058.
- Mulder J, Zilberter M, Spence L, Tortoriello G, Uhlen M, Yanagawa Y, Aujard F, Hökfelt T, Harkány T. (2009). Secretagogin is a Ca<sup>2+</sup>-binding protein specifying subpopulations of telencephalic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(52), 22492-22497. doi: 10.1073/pnas.0912484106
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211.
- Muller LJ, Verwer RW, Nunes Cardozo B, Vrensen G. (1984). Synaptic characteristics of identified pyramidal and multipolar non-pyramidal neurons in the visual cortex of young and adult rabbits. A quantitative Golgi-electron microscope study. *Neuroscience*, 12(4), 1071-1087.
- Murakami T, Murakami T, Hong LJ, Su WD, Piao DX, Mahmut N, Ohtsuka A. (1997). Perineuronal sulfated proteoglycans and cell surface glycoproteins in adult and newborn mouse brains, with special reference to their postnatal developments. *Arch Histol Cytol*, 60(4), 347-354.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 254(5028), 97-99.
- Nakagawa F, Schulte BA, Wu JY, Spicer SS. (1987). Postnatal appearance of glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine on the surface of selected neurons in mouse brain. *Dev Neurosci*, 9(1), 53-60.
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 20(14), 5329-5338.
- Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*, 283(12), 1571-1577.
- Negishi M, Katoh H. (2002). Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J Biochem*, 132(2), 157-166.
- Niblock MM, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR. (2000). Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci*, 20(11), 4165-4176.
- Nishida E, Gotoh Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci*, 18(4), 128-131.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 7(9), 697-709. doi: 10.1038/nrn1970
- Noda M, Ko M, Ogura A, Liu DG, Amano T, Takano T, Ikawa Y. (1985). Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature*, 318(6041), 73-75.
- O'Callaghan P, Sandwall E, Li JP, Yu H, Ravid R, Guan ZZ, van Kuppevelt TH, Nilsson LN, Ingelsson M, Hyman BT, Kalimo H, Lindahl U, Lannfelt L, Zhang X. (2008). Heparan sulfate accumulation with Abeta deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is



- contributed by glial cells. *Brain Pathol*, 18(4), 548-561. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00152.x
- Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A, Kano M. (2002). Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci*, 22(10), 3864-3872. doi: 20026387
- Ohsawa I, Takamura C, Kohsaka S. (1997). The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(1), 59-65. doi: 10.1006/bbrc.1997.6903
- Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur J Neurosci*, 11(6), 1907-1913.
- Ojima H, Sakai M, Ohyama J. (1998). Molecular heterogeneity of Vicia villosa-recognized perineuronal nets surrounding pyramidal and nonpyramidal neurons in the guinea pig cerebral cortex. *Brain Res*, 786(1-2), 274-280.
- Oláh J, Vincze O, Virók D, Simon D, Bozsó Z, Tókési N, Horváth I, Hlavanda E, Kovács J, Magyar A, Szűcs M, Orosz F, Penke B, Ovádi J. (2011). Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 286(39), 34088-34100. doi: 10.1074/jbc.M111.243907
- Oláh Z, Pákáski M, Janka Z, Kálmán J. (2012). Marking the markers of Alzheimer's: too good to diagnose, too bad to use? *Neuropsychopharmacol Hung*, 14(3), 165-176.
- Otani S, Blond O, Desce JM, Crepel F. (1998). Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex. *Neuroscience*, 85(3), 669-676.
- Pákáski M, Fehér A, Juhász A, Drótos G, Fazekas OC, Kovács J, Janka Z, Kálmán J. (2014). Serum adipokine levels modified by donepezil treatment in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 38(2), 371-377. doi: 10.3233/JAD-131139
- Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, Sagredo O, Benito C, Romero J, Azcoitia I, Fernandez-Ruiz J, Guzman M, Galve-Roperh I. (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain*, 132(Pt 11), 3152-3164. doi: 10.1093/brain/awp239
- Palop JJ, Mucke L. (2009). Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 66(4), 435-440. doi: 10.1001/archneurol.2009.15
- Papp E, Pákáski M, Drótos G, Kálmán J. (2012). [Validation of the Hungarian version of Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog) in patients with mild cognitive impairment]. *Psychiatr Hung*, 27(6), 426-434.
- Papp MI, Kovács T. (2013). Progression of Alzheimer-type neurofibrillary tangles is related to the proximodistal segments of the hemispheric arteries. *Curr Alzheimer Res*, 10(8), 818-828.
- Paxinos, Watson. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Penke B, Tóth AM, Földi I, Szűcs M, Janáky T. (2012). Intraneuronal beta-amyloid and its interactions with proteins and subcellular organelles. *Electrophoresis*, 33(24), 3608-3616. doi: 10.1002/elps.201200297
- Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci*, 17(24), 9407-9414.
- Phillips LL, Belardo ET. (1994). Increase of c-fos and ras oncoproteins in the denervated neuropil of the rat dentate gyrus. *Neuroscience*, 58(3), 503-514.

- Phinney AL, Calhoun ME, Wolfer DP, Lipp HP, Zheng H, Jucker M. (1999). No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged beta-amyloid precursor protein-null mice. *Neuroscience*, 90(4), 1207-1216.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298(5596), 1248-1251. doi: 10.1126/science.1072699
- Polgár T, Keserű GM. (2014). Structure-based beta-secretase (BACE1) inhibitors. *Curr Pharm Des*, 20(20), 3373-3379.
- Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F. (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature*, 331(6156), 525-527. doi: 10.1038/331525a0
- Pope SK, Shue VM, Beck C. (2003). Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu Rev Public Health*, 24, 111-132. doi: 10.1146/annurev.publhealth.24.100901.141015
- Price DL, Walker LC, Martin LJ, Sisodia SS. (1992). Amyloidosis in aging and Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 141(4), 767-772.
- Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. (1988). Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*, 336(6195), 123-128. doi: 10.1038/336123a0
- Pyapali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsáki G, Turner DA. (1998). Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *J Comp Neurol*, 391(3), 335-352.
- Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, Selkoe DJ. (1995). Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci*, 15(3 Pt 2), 2157-2167.
- Rácz E, Gaál B, Kecskés S, Matesz C. (2014). Molecular composition of extracellular matrix in the vestibular nuclei of the rat. *Brain Struct Funct*, 219(4), 1385-1403. doi: 10.1007/s00429-013-0575-x
- Radak Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. (2010). Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20(3), 777-783. doi: 10.3233/JAD-2010-091531
- Rakic P. (2002). Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci*, 3(1), 65-71. doi: 10.1038/nrn700
- Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci*, 25(8), 1904-1913. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4540-04.2005
- Raymond CR, Ireland DR, Abraham WC. (2003). NMDA receptor regulation by amyloid-beta does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus. *Brain Res*, 968(2), 263-272.
- Redmond L, Ghosh A. (2001). The role of Notch and Rho GTPase signaling in the control of dendritic development. *Curr Opin Neurobiol*, 11(1), 111-117.
- Riederer BM, Berbel P, Innocenti GM. (2004). Neurons in the corpus callosum of the cat during postnatal development. *Eur J Neurosci*, 19(8), 2039-2046. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03305.x
- Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an

- Alzheimer's disease mouse model. *Science*, 316(5825), 750-754. doi: 10.1126/science.1141736
- Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, Power M, Masliah E, Mucke L. (1995). Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 270(47), 28257-28267.
- Rogers LJ. (1993). The molecular neurobiology of early learning, development, and sensitive periods, with emphasis on the avian brain. *Mol Neurobiol*, 7(3-4), 161-187. doi: 10.1007/BF02769174
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. (1998a). p75 and TrkA receptor signaling independently regulate amyloid precursor protein mRNA expression, isoform composition, and protein secretion in PC12 cells. *J Neurochem*, 71(2), 757-766.
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. (1998b). The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol*, 56(5), 541-569.
- Ruchhoeft ML, Ohnuma S, McNeill L, Holt CE, Harris WA. (1999). The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *J Neurosci*, 19(19), 8454-8463.
- Sadot E, Jaaro H, Seger R, Ginzburg I. (1998). Ras-signaling pathways: positive and negative regulation of tau expression in PC12 cells. *J Neurochem*, 70(1), 428-431.
- Salinero O, Moreno-Flores MT, Wandosell F. (2000). Increasing neurite outgrowth capacity of beta-amyloid precursor protein proteoglycan in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 60(1), 87-97.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478(7369), 382-386. doi: 10.1038/nature10487
- Sanes, Lichtman. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Review Neurosciences*, 2, 791-805.
- Schaefer AT, Larkum ME, Sakmann B, Roth A. (2003). Coincidence detection in pyramidal neurons is tuned by their dendritic branching pattern. *J Neurophysiol*, 89(6), 3143-3154. doi: 10.1152/jn.00046.2003
- Scheibel AB, Tomiyasu U. (1978). Dendritic sprouting in Alzheimer's presenile dementia. *Exp Neurol*, 60(1), 1-8.
- Scholefield Z, Yates EA, Wayne G, Amour A, McDowell W, Turnbull JE. (2003). Heparan sulfate regulates amyloid precursor protein processing by BACE1, the Alzheimer's beta-secretase. *J Cell Biol*, 163(1), 97-107. doi: 10.1083/jcb.200303059
- Schubert W, Prior R, Weidemann A, Dirksen H, Multhaup G, Masters CL, Beyreuther K. (1991). Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res*, 563(1-2), 184-194.
- Schwaller B, Buchwald P, Blumcke I, Celio MR, Hunziker W. (1993). Characterization of a polyclonal antiserum against the purified human recombinant calcium binding protein calretinin. *Cell Calcium*, 14(9), 639-648.
- Scott EK, Luo L. (2001). How do dendrites take their shape? *Nat Neurosci*, 4(4), 359-365. doi: 10.1038/86006
- Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, Morton RA, Zheng H, Dawson GR, Sirinathsinghji DJ, Davies CH, Collingridge GL, Hill RG. (1999). Mechanisms

- contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*, 38(3), 349-359.
- Seeger G, Gärtner U, Holzer M, Arendt T. (2003). Constitutive expression of p21H-Ras(Val12) in neurons induces increased axonal size and dendritic microtubule density in vivo. *J Neurosci Res*, 74(6), 868-874. doi: 10.1002/jnr.10838
- Seeger G, Gartner U, Ueberham U, Rohn S, Arendt T. (2009). FAD-mutation of APP is associated with a loss of its synaptotrophic activity. *Neurobiol Dis*, 35(2), 258-263. doi: 10.1016/j.nbd.2009.05.003
- Selkoe DJ. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4), 487-498.
- Selkoe DJ. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81(2), 741-766.
- Selkoe DJ. (2008a). Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*, 89, 245-260. doi: 10.1016/S0072-9752(07)01223-7
- Selkoe DJ. (2008b). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*, 192(1), 106-113. doi: 10.1016/j.bbr.2008.02.016
- Senechal Y, Prut L, Kelly PH, Staufienbiel M, Natt F, Hoyer D, Wiessner C, Dev KK. (2008). Increased exploratory activity of APP23 mice in a novel environment is reversed by siRNA. *Brain Res*, 1243, 124-133. doi: 10.1016/j.brainres.2008.09.024
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 478(4), 359-378. doi: 10.1002/cne.20288
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, 359(6393), 325-327. doi: 10.1038/359325a0
- Shahani N, Brandt R. (2002). Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci*, 59(10), 1668-1680.
- Shigematsu K, McGeer PL, McGeer EG. (1992). Localization of Amyloid Precursor Protein in Selective Postsynaptic Densities of Rat Cortical-Neurons. *Brain Res*, 592(1-2), 353-357. doi: Doi 10.1016/0006-8993(92)91697-D
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258(5079), 126-129.
- Sholl DA. (1950). A discussion on the measurement of growth and form; the theory of differential growth analysis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 137(889), 470-474.
- Simon AM, Schiapparelli L, Salazar-Colocho P, Cuadrado-Tejedor M, Escribano L, Lopez de Maturana R, Del Rio J, Perez-Mediavilla A, Frechilla D. (2009). Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to Abeta levels. *Neurobiol Dis*, 33(3), 369-378. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.005
- Simon GM, Cravatt BF. (2008). Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem*, 283(14), 9341-9349. doi: 10.1074/jbc.M707807200
- Sin WC, Haas K, Ruthazer ES, Cline HT. (2002). Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature*, 419(6906), 475-480. doi: 10.1038/nature00987
- Sipos E, Kurunczi A, Kasza A, Horváth J, Felszeghy K, Laroche S, Toldi J, Párducz A, Penke B, Penke Z. (2007). Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces

- memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 147(1), 28-36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.011
- Sisodia SS. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13), 6075-6079.
- Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL. (1993). Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci*, 13(7), 3136-3142.
- Sisodia SS, Price DL. (1992). Amyloidogenesis in Alzheimer's disease: basic biology and animal models. *Curr Opin Neurobiol*, 2(5), 648-652.
- Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*, 14(4), 2117-2127.
- Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Craddock SD, Culwell AR, Rydel RE, Mattson MP. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J Neurochem*, 63(2), 781-784.
- Smith SJ. (1999). Dissecting dendrite dynamics. *Science*, 283(5409), 1860-1861.
- Snow AD, Sekiguchi RT, Nochlin D, Kalaria RN, Kimata K. (1994). Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol*, 144(2), 337-347.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*, 8(8), 1051-1058. doi: 10.1038/nn1503
- Soloway AS, Pucak ML, Melchitzky DS, Lewis DA. (2002). Dendritic morphology of callosal and ipsilateral projection neurons in monkey prefrontal cortex. *Neuroscience*, 109(3), 461-471.
- Somogyi P, Cowey A. (1984). Double bouquet cells. In Peters és E. G. Jones (Eds.), *Cereb Cortex* (Vol. I., pp. 337-360): Plenum Press, New York.
- Song HJ, Poo MM. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol*, 9(3), 355-363.
- Sterio DC. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*, 134(Pt 2), 127-136.
- Stettler DD, Yamahachi H, Li W, Denk W, Gilbert CD. (2006). Axons and synaptic boutons are highly dynamic in adult visual cortex. *Neuron*, 49(6), 877-887. doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.018
- Storey KB, Storey JM. (2004). Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79(1), 207-233.
- Storey KB, Storey JM. (2007). Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause'--molecular regulation of hypometabolism. *J Exp Biol*, 210(Pt 10), 1700-1714. doi: 10.1242/jeb.02716
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. (2007). Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*, 17(11), 1017-1022. doi: 10.1002/hipo.20348
- Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. (1992). Localization of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 51(4), 801-813.
- Sykova E, Nicholson C. (2008). Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev*, 88(4), 1277-1340. doi: 10.1152/physrev.00027.2007

- Szigeti C, Bencsik N, Simonka AJ, Légrádi A, Kása P, Gulya K. (2013). Long-term effects of selective immunolesions of cholinergic neurons of the nucleus basalis magnocellularis on the ascending cholinergic pathways in the rat: a model for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 94, 9-16. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.01.007
- Tackenberg C, Brandt R. (2009). Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid-beta, wild-type tau, and R406W tau. *J Neurosci*, 29(46), 14439-14450. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3590-09.2009
- Tanaka T, Ida N, Shimoda H, Waki C, Slamon DJ, Cline MJ. (1986). Organ specific expression of ras oncoproteins during growth and development of the rat. *Mol Cell Biochem*, 70(1), 97-104.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235(4791), 880-884.
- Taupin P, Gage FH. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*, 69(6), 745-749. doi: 10.1002/jnr.10378
- Teather LA, Magnusson JE, Chow CM, Wurtman RJ. (2002). Environmental conditions influence hippocampus-dependent behaviours and brain levels of amyloid precursor protein in rats. *Eur J Neurosci*, 16(12), 2405-2415.
- Terai K, Iwai A, Kawabata S, Tasaki Y, Watanabe T, Miyata K, Yamaguchi T. (2001). beta-amyloid deposits in transgenic mice expressing human beta-amyloid precursor protein have the same characteristics as those in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 104(2), 299-310.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30(4), 572-580. doi: 10.1002/ana.410300410
- Thal DR, Hartig W, Schober R. (1999). Diffuse plaques in the molecular layer show intracellular A beta(8-17)-immunoreactive deposits in subpial astrocytes. *Clin Neuropathol*, 18(5), 226-231.
- Thoenen H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270(5236), 593-598.
- Ting JT, Kelley BG, Lambert TJ, Cook DG, Sullivan JM. (2007). Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1), 353-358. doi: 10.1073/pnas.0608807104
- Tole S, Christian C, Grove EA. (1997). Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. *Development*, 124(24), 4959-4970.
- Tóth A, Blumberg PM, Boczan J. (2009). Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam Horm*, 81, 389-419. doi: 10.1016/S0083-6729(09)81015-7
- Tóth ME, Szegedi V, Varga E, Juhász G, Horváth J, Borbély E, Csibrány B, Alföldi R, Lénárt N, Penke B, Sántha M. (2013). Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress Chaperones*, 18(6), 759-771. doi: 10.1007/s12192-013-0428-9
- Tömböl T. (1988). Comparative study of the early postnatal chicken and pigeon brain. A Golgi-study of telencephalon and cerebellum. *J Hirnforsch*, 29(5), 557-567.
- Tömböl T. (1995). *Golgi structure of telencephalon of chicken*. Budapest: Abaevo Press.

- Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB. (2004). Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci*, 7(11), 1181-1183. doi: 10.1038/nn1335
- Tucker KL. (2002). Neurotrophins and the control of axonal outgrowth. *Panminerva Med*, 44(4), 325-333.
- Turner DA, Buhl EH, Hailer NP, Nitsch R. (1998). Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. *Prog Neurobiol*, 55(6), 537-562.
- Turner DA, Schwartzkroin PA. (1980). Steady-state electrotonic analysis of intracellularly stained hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 44(1), 184-199.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, 70(1), 1-32.
- Ueda N, Okamoto Y, Morishita J. (2005). N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D: a novel enzyme of the beta-lactamase fold family releasing anandamide and other N-acylethanolamines. *Life Sci*, 77(14), 1750-1758. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.018
- Uhász GJ, Barkóczi B, Vass G, Datki Z, Hunya A, Fülöp L, Budai D, Penke B, Szegedi V. (2010). Fibrillar Aβ(1-42) enhances NMDA receptor sensitivity via the integrin signaling pathway. *J Alzheimers Dis*, 19(3), 1055-1067. doi: 10.3233/JAD-2009-1301
- Valverde F. (1971). Rate and extent of recovery from dark rearing in the visual cortex of the mouse. *Brain Res*, 33(1), 1-11.
- Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, Hardy JA, Van Hul W, Wehnert A, Vegter-Van der Vlis M, Roos RA. (1990). Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science*, 248(4959), 1120-1122.
- van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, Micale V, Steardo L, Drago F, Iuvone T, Di Marzo V. (2006). Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci*, 63(12), 1410-1424. doi: 10.1007/s00018-006-6037-3
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2(3), 266-270. doi: 10.1038/6368
- Varga J, Klausz B, Domokos A, Kálmán S, Pákási M, Szűcs S, Garab D, Zvara A, Puskás L, Kálmán J, Tímár J, Bagdy G, Zelena D. (2014). Increase in Alzheimer's related markers precedes memory disturbances: studies in vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Brain Res Bull*, 100, 6-13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.10.010
- Verbeek MM, Otte-Holler I, van den Born J, van den Heuvel LP, David G, Wesseling P, de Waal RM. (1999). Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol*, 155(6), 2115-2125. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65529-0
- Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C. (2007). Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 27(25), 6771-6780. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5564-06.2007
- Viapiano MS, Matthews RT. (2006). From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol Med*, 12(10), 488-496. doi: 10.1016/j.molmed.2006.08.007
- Volgushev M, Vidyasagar TR, Chistiakova M, Eysel UT. (2000). Synaptic transmission in the neocortex during reversible cooling. *Neuroscience*, 98(1), 9-22.
- von der Ohe CG, Garner CC, Darian-Smith C, Heller HC. (2007). Synaptic protein dynamics in hibernation. *J Neurosci*, 27(1), 84-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4385-06.2007

- Von Kriegstein K, Schmitz F, Link E, Sudhof TC. (1999). Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses. *Eur J Neurosci*, 11(4), 1335-1348.
- Wagner L, Oliyarnyk O, Gärtner W, Nowotny P, Groeger M, Kaserer K, Waldhausl W, Pasternack MS. (2000). Cloning and expression of secretagogin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *J Biol Chem*, 275(32), 24740-24751. doi: 10.1074/jbc.M001974200
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ. (2002). Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans*, 30(4), 552-557. doi: 10.1042/
- Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL. (2002). Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*, 924(2), 133-140.
- Wegner F, Härtig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, Brückner G. (2003). Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol*, 184(2), 705-714. doi: 10.1016/S0014-4886(03)00313-3
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57(1), 115-126.
- Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. (1997). Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*, 272(22), 13997-14000.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(5), 1858-1862.
- Weller WL, Johnson JL. (1975). Barrels in cerebral cortex altered by receptor disruption in newborn, but not in five-day-old mice (Cricetidae and Muridae). *Brain Res*, 83(3), 504-508.
- West MJ. (1999). Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci*, 22(2), 51-61.
- Wise SP, Fleshman JW, Jr., Jones EG. (1979). Maturation of pyramidal cell form in relation to developing afferent and efferent connections of rat somatic sensory cortex. *Neuroscience*, 4(9), 1275-1297.
- Wisniewski HM, Bancher C, Barcikowska M, Wen GY, Currie J. (1989). Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 78(4), 337-347.
- Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G. (2006). Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 60(12), 1314-1323. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.04.004
- Workman JL, Bowers SL, Nelson RJ. (2009). Enrichment and photoperiod interact to affect spatial learning and hippocampal dendritic morphology in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Eur J Neurosci*, 29(1), 161-170. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06570.x
- Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW. (2001). Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci*, 4(2), 151-158. doi: 10.1038/83976



- Wu Y, Wu J, Lee DY, Yee A, Cao L, Zhang Y, Kiani C, Yang BB. (2005). Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix Biol*, 24(1), 3-13. doi: 10.1016/j.matbio.2004.11.007
- Yamada H, Fredette B, Shitara K, Hagihara K, Miura R, Ranscht B, Stallcup WB, Yamaguchi Y. (1997). The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J Neurosci*, 17(20), 7784-7795.
- Yang X, Arber S, William C, Li L, Tanabe Y, Jessell TM, Birchmeier C, Burden SJ. (2001). Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron*, 30(2), 399-410.
- Yoles E, Belkin M, Schwartz M. (1996). HU-211, a nonpsychotropic cannabinoid, produces short- and long-term neuroprotection after optic nerve axotomy. *J Neurotrauma*, 13(1), 49-57.
- Yoshida T, Hashimoto K, Zimmer A, Maejima T, Araishi K, Kano M. (2002). The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, 22(5), 1690-1697.
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene*, 87(2), 257-263.
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, 53(3), 337-351. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010
- Young, Clark, Goffus, Hoane. (2009). Mixed effects modeling of Morris water maze data: Advantages and cautionary notes. *Learning and Motivation*, 40, 160-177.
- Záborszky L, Pang K, Somogyi J, Nádasdy Z, Kálló I. (1999). The basal forebrain corticopetal system revisited. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 339-367.
- Zádori D, Veres G, Szalárdy L, Klivényi P, Toldi J, Vécsei L. (2014). Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *J Alzheimers Dis*, 42 Suppl 3, S177-187. doi: 10.3233/JAD-132621
- Zayats N, Davies DC, Nemeth A, Tombol T. (2002). The intrinsic neuronal organisation of the nucleus of the basal optic root in the domestic chicken; a light and electron microscopic study using anterograde tracers and postembedding GABA-immunostaining. *Eur J Morphol*, 40(2), 101-113.
- Zhang C, McNeil E, Dressler L, Siman R. (2007). Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 204(1), 77-87. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.09.018
- Zhao H, Bucci DJ, Weltzin M, Drew KL. (2004). Effects of aversive stimuli on learning and memory in Arctic ground squirrels. *Behav Brain Res*, 151(1-2), 219-224. doi: 10.1016/j.bbr.2003.08.017
- Zimmer J, Haug FM. (1978). Laminar differentiation of the hippocampus, fascia dentata and subiculum in developing rats, observed with the Timm sulphide silver method. *J Comp Neurol*, 179(3), 581-617. doi: 10.1002/cne.901790309